



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Gripe Suína: Estudo-de-caso em quatro suiniculturas intensivas da Comunidade Autónoma da Catalunha, Espanha

CATARINA AGOSTINHO ANTÃO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Prof. Doutor Jordi Casal i Fàbrega
Prof. Doutor Virgílio da Silva Almeida
Prof. Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Prof. Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Prof. Doutor Jordi Casal i Fàbrega

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutor Virgílio da Silva Almeida

2009
LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Gripe Suína: Estudo-de-caso em quatro
suiniculturas intensivas da Comunidade
Autónoma da Catalunha, Espanha**

CATARINA AGOSTINHO ANTÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Prof. Doutor Jordi Casal i Fàbrega
Prof. Doutor Virgílio da Silva Almeida
Prof. Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Prof. Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Prof. Doutor Jordi Casal i Fàbrega

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutor Virgílio da Silva Almeida

2009
LISBOA

Agradecimentos

Ao Orientador Professor Doutor Jordi Casal i Fàbrega pela aceitação de orientação do estágio e pela forma como geriu o desenvolvimento do mesmo, bem como pela ajuda na definição do horizonte da investigação;

Ao Co-orientador Professor Doutor Virgílio Almeida, pelo apoio técnico-científico dado, a confiança demonstrada e a forma como me incentivou a superar os obstáculos, bem como pela ajuda na realização da dissertação;

À Dra. Meritxell Simon, ao Dr. Gerard Martin, ao Doutor Ignacio Bocanegra, ao Doutor Alberto Allepuz, ao Dr. Sebastian Avelli e ao Eng^o Rubén Cordón pelo apoio e pela transmissão de conhecimentos;

Ao Dr. Telmo Nunes, à Dra. Filipa Baptista e ao Eng. Hugo Martins, ao Dr. António Galvão e ao Diogo Marques pelo apoio e ajuda na realização da dissertação;

Ao Prof. Doutor. Ian Brown, ao Prof. Doutor Timm Harder, ao Dr. Jaime Maldonado, ao Doutor Willie Loeffen, ao Dr. Sandro Nunes, à Dra. Joana Monteiro e ao Doutor Miguel Fevereiro pela informação cedida;

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e me ajudaram a seguir em frente

À minha família, agradeço todo o apoio, carinho e incentivos demonstrados durante toda a minha vida académica.

Resumo

A gripe é uma das doenças infecciosas com maior impacto na história da humanidade devido às pandemias ocorridas nos últimos 100 anos. Nos suínos, o vírus influenza é responsável pela Doença Respiratória Aguda associada a elevados prejuízos económicos. A importância da vigilância epidemiológica do vírus influenza em suínos reside no facto desta espécie ser susceptível à infecção por vírus de origem suína, aviar e humana. A infecção dum mesmo animal com diferentes estirpes e/ou subtipos pode resultar na geração dum novo vírus.

Durante a redacção da presente dissertação, o aparecimento duma nova estirpe do subtipo H1N1 fez com que suspendesse esta tarefa durante uma quinzena para acompanhar a evolução da infecção no Homem. No entanto, à data de entrega desta dissertação não está demonstrado que esta nova estirpe tenha tido origem em suínos.

O trabalho foi realizado na sequência dum estágio realizado no Centre de Recerca en Sanitat Animal (Barcelona, Espanha) em 4 explorações localizadas na Comunidade Autónoma da Catalunha. A colheita de amostras biológicas foi acompanhada da realização dum inquérito epidemiológico aos produtores. As amostras de sangue de animais de 20 semanas de idade e de reprodutoras foram analisadas num teste ELISA e posteriormente pela inibição da hemaglutinação. Foi realizada uma análise estatística descritiva dos resultados obtidos que são concordantes com os estudos europeus consultados. De facto, os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 cocirculam nas suiniculturas por todo o mundo com predominância do subtipo H3N2 (100%) nas explorações investigadas; existe diferença significativa das seroprevalências ($p < 0,05$) entre animais de 20 semanas de idade e reprodutoras; os sistemas de produção, as características das explorações e as medidas de biossegurança implementadas influenciam a seroprevalência do vírus influenza.

A vigilância da emergência de novos subtipos no suíno deve integrar a vigilância dos vírus aviários e humanos, principalmente nas áreas de maior risco, onde as elevadas densidades animais favorecem o contacto entre espécies susceptíveis.

É importante desenhar, testar e implementar uma rede de vigilância epidemiológica da gripe suína em Portugal. As pandemias de H5N1 e de gripe mexicana (H1N1), ainda em evolução, são exemplos de cenários epidemiológicos mas também sócio-económicos e políticos que requerem este tipo de informação para tomadas de decisão de Saúde Humana e Animal.

Palavras-chave: vírus influenza, gripe suína, Comunidade Autónoma da Catalunha.

Abstract

The importance of influenza virus is reported in our history by the pandemics of flu during the last 100 years. Swine influenza virus, responsible for Acute Respiratory Disease, has an important economic impact.

Swine are susceptible to different influenza virus, as avian, human or swine, being the concomitant infection of the same animal with several strains and/or subtypes determinant for the generation of a new virus. This factor illustrates the importance of a constant epidemiological surveillance.

The elaboration of the present thesis was suspended by the recent emergence of a new H1N1 strain, to monitor the international progression of the disease and the knowledge about the biology of the virus. Even though, it was not confirmed that the swine was the origin of this new virus.

This report is the result of 4 months of internment ship at CReSA - Centre de Recerca en Sanitat Animal (Barcelona, Spain). Four herds located in Catalunya (Barcelona, Spain) were used for sampling sows and pigs with 20 weeks age.

All blood samples were tested by ELISA and the positive ones were confirmed by hemagglutination inhibition.

Descriptive statistical analyses were performed with the hemagglutination inhibition results. Our findings are similar to those found by other researchers. Three subtypes – H1N1, H1N2 and H3N2 - cocirculate in most herds worldwide. In this study, H3N2 showed a seroprevalence of 100%; seroprevalences were significantly higher ($p < 0,05$) in sows than in pigs at 20 weeks of age; seroprevalences were influenced by the production system, the herd type and biosecurity measures.

Swine influenza surveillance must embrace both avian and Human viruses, specially in higher density areas where there is an increased risk for interspecies contact.

The implementation of a network of epidemiological surveillance for swine flu is crucial for its prevention and control in Portugal. H5N1 and Mexican flu (H1N1), still progressing, are examples of pandemic, where socio-economic and political events required an accurate control and information on the behalf of Public and Animal Health.

Key-words: Influenza virus, swine flu, *Comunidade Autónoma da Catalunya*

ÍNDICE GERAL

1.	Actividades desenvolvidas durante o período de estágio	1
1.1	Recolha e processamento de amostras biológicas	1
1.2	Diagnóstico laboratorial	2
1.3	Análise de dados	2
1.4	Outras actividades realizadas	3
1.5	Complementos de formação teórica	3
2.	Introdução	4
3.	Revisão Bibliográfica	6
3.1	História	6
3.2	Etiologia	8
3.3	Epidemiologia	9
3.3.1	Pandemiologia	11
3.3.1.1	Transmissão entre o porco e o Homem	13
3.3.1.2	Transmissão entre o porco e as aves	14
3.4	Sinais clínicos	14
3.4.1	Doença Respiratória Aguda	15
3.5	Patogenia	16
3.6	Resposta Imunitária	17
3.6.1	Imunidade de origem materna	18
3.6.2	Imunidade cruzada	19
3.7	Diagnóstico	20
3.8	Dinâmica do vírus na exploração	22
3.9	Prevenção e controlo	23
3.9.1	Vacinação	23
3.10	Impacto económico	25
3.11	Vigilância Epidemiológica	26
3.11.1	Europa	26
3.11.2	Ásia	27
3.11.3	Estados Unidos da América	28
4.	Materiais e métodos	29
4.1	Amostragem	29
4.2	Seleção das unidades amostrais (explorações)	29
4.3	Inquérito Epidemiológico	29
4.4	Materiais para recolha de amostras biológicas	30
4.5	Colheita de amostras biológicas	31
4.6	Processamento das amostras biológicas	33
4.7	Diagnóstico laboratorial	33
4.8	Cultura celular e multiplicação viral	33
4.9	ELISA	34
4.10	Inibição da Hemaglutinação	34
4.10.1	Processamento do soro sanguíneo	35
4.10.2	Estandarização do vírus	35
4.10.3	Diluições	35
4.11	Análise estatística	35
5.	Resultados	36
6.	Discussão	41
7.	Conclusão	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Instalações do Centre de Recerca en Sanitat Animal	1
Figura 2 – Municípios visitados durante a recolha de amostras biológicas	2
Figura 3 – Ecologia dos vírus influenza (http://www.cdc.gov/)	4
Figura 4 – Estrutura do virião	8
Figura 5 – <i>Antigenic Shift</i> e <i>Antigenic Drift</i> (Medical Encyclopedia, 2009)	9
Figura 6 – Reactividade de tecido respiratório humano a lectinas específicas para diferentes ligações ao ácido siálico	12
Figura 7 – Epitélio respiratório de suíno infectado experimentalmente com vírus influenza	17
Figura 8 – Influência dos AcM na resposta imunitária dos leitões	19
Figura 9 – Interferência dos Ac de origem materna na eficácia da vacinação	25
Figura 10 – Realização do inquérito epidemiológico ao produtor	30
Figura 11 – Colheita de sangue pela veia jugular em leitões de 3 semanas	32
Figura 12 – Colheita de sangue na veia jugular em suínos de 15 semanas	32
Figura 13 – Colheita de sangue na veia coccígea em reprodutoras	32
Figura 14 – Identificação e acondicionamento das amostras de sangue em caixa isotérmica	33
Figura 15 – Cultura de células MDCK	34
Figura 16 – Contacto entre suínos e aves	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Subtipos do vírus influenza tipo A endémicos nas populações de suínos	7
Tabela 2 – Diferenças de subtipos entre continentes (adaptado de Maldonado, 2007)	11
Tabela 3 – Vacinas disponíveis no mercado europeu (ESNIP, 2001-2003)	23
Tabela 4 – Caracterização das 4 explorações de suínos investigadas	30
Tabela 5 – Resultados do teste de IH para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 em reprodutoras	36
Tabela 6 – Resultados do teste de IH para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 em leitões de 20 semanas de idade	37
Tabela 7 – Prevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas quatro explorações, em reprodutoras e leitões de 20 semanas, nas explorações 1, 2, 3 e 4, nas explorações com sistema de produção em ciclo fechado (2 e 3) e nas explorações com sistema de produção em múltiplas fases (4)	37
Tabela 8 - Prevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 para reprodutoras e leitões de 20 semanas em sistema de produção fechado	39
Tabela 9 – Prevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 para reprodutoras e leitões de 20 semanas em sistema de produção em múltiplas fases	39
Tabela 10 - Proporção de animais positivos aos 3 subtipos, a 2 subtipos e a 1 subtipo para reprodutoras e leitões de 20 semanas de idade	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Prevalência do vírus influenza por estação do ano (ESNIP2, 2006-2008)	10
Gráfico 2 – Proporção seropositivos por faixa etária (ESNIP2, 2006-2008)	27
Gráfico 3 - Proporção de reprodutoras seropositivas em 7 países da Europa em 2002-2003	27
Gráfico 4 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2	37

Gráfico 5 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 em reprodutoras e em leitões de 20 semanas _____	38
Gráfico 6 - Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas suiniculturas 1, 2, 3 e 4 _____	38
Gráfico 7 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas explorações 2 e 3 (sistema de produção em múltiplas fases) e na exploração 4 (sistema de produção em ciclo fechado) _____	39
Gráfico 8 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas explorações 2 e 3 (sistema de produção em múltiplas fases) e na exploração 4 (sistema de produção em ciclo fechado) em reprodutoras e em leitões de 20 semanas____	40
Gráfico 9 – Proporção de suínos positivos a 3 subtipos, 2 subtipos e a 1 subtipo _____	41

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Percentagem
µl	Microlitro
Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo de origem materna
CO ₂	Dióxido de carbono
CreSA	Centre de Recerca en Sanitat Animal
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESNIP	The European surveillance network for influenza in pigs
HA	Hemaglutinação
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
IFD	Imunofluorescência directa
IFN α	Interferão α
IgA / IgG / IgM	Imunoglobulina
IH	Inibição da hemaglutinação
IL-1/ IL-6	Interleucina
M1 / M2	Matriz
MDCK	Madin Darby canine kidney
MEM	Minimum essential medium
ml	Mililitro
NA	Neuraminidase
nm	Nanómetro
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural
NV	Neutralização viral
°C	Graus Celsius
OIE	Office International des Épizooties
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
PA / PB1 / PB2	Polimerases
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Após a inoculação
PRRS	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
RDE	Receptor destroying-enzyme
Rotações por minuto	rpm
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNF α	Factor de necrose tumoral α
UH	Unidades hemaglutinantes

1. Actividades desenvolvidas durante o período de estágio

O Estágio Final Curricular foi realizado sob a orientação do Doutor Jordi Casal i Fàbrega, Professor Catedrático de Epidemiologia da Facultat de Veterinària da Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha. Decorreu no período de 01.10.2008 a 31.01.2009 no Centre de Recerca en Sanitat Animal (CreSA), Barcelona, na área de Sanidade Animal.

O estágio foi desenvolvido no âmbito de um projecto de investigação do CReSA sobre gripe suína: *“Epidemiología de la Influenza porcina em España: prevalência, subtipos existentes y modelo epidemiológico de evolución de la infección en granjas de porcino (EPIP)”*.

Figura 1 – Instalações do Centre de Recerca en Sanitat Animal



Durante os quatro meses do estágio tive a oportunidade de integrar a equipa dum projecto de investigação cujo principal objectivo era determinar os subtipos do vírus influenza presentes na população suína em Espanha e calcular a sua prevalência.

O projecto decorreu em três fases:

- 1) recolha de amostras biológicas + realização de inquérito ao produtor;
- 2) diagnóstico laboratorial;
- 3) análise estatística dos dados.

1.1 Recolha e processamento de amostras biológicas

O plano de amostragem exigiu a colheita de sangue e de fezes em 97 explorações que foram estratificadas pelas várias Comunidades Autónomas de Espanha, de acordo com censo porcino de 2007 de cada Comunidade. Das explorações seleccionadas participei activamente na recolha de amostras biológicas em 19 explorações.

Acompanhada por dois outros membros da equipa, visitei essas dezanove suiniculturas em três viagens de dez dias por 4 Comunidades Autónomas: Andaluzia e Múrcia (6 explorações), Castilla-La Mancha (7 explorações) e Valência (6 explorações) (Figura 2). Fui encarregue de toda a operação logística, nomeadamente da preparação, acondicionamento e verificação do material necessário para a recolha das amostras biológicas.

Figura 2 – Municípios visitados durante a recolha de amostras biológicas



1.2 Diagnóstico laboratorial

A actividade laboratorial incluiu a identificação de vírus influenza, recorrendo às técnicas serológicas de inibição da hemaglutinação (IH) e de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Nesta fase efectuei:

1. extracção de amostras;
2. etiquetagem de material;
3. culturas de células e passagens;
4. titulações virais;

e acompanhei o tratamento de soros; a preparação de reagentes; a infecção de células e as técnicas de IH.

Os testes ELISA foram realizados por outra equipa do projecto.

1.3 Análise de dados

A análise estatística dos dados foi realizada na UISEE (Unidade de Investigação e Serviços de Epidemiologia Económica) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Durante o processamento dos dados tive oportunidade de reforçar e expandir as minhas bases teóricas de Epidemiologia e de melhorar o meu nível de utilizador de programas informáticos de armazenamento, gestão e análise de dados, nomeadamente o programa Microsoft Office Excel 2007 e o SPSS Statistics 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

1.4 Outras actividades realizadas

Língua Azul – acompanhei também uma equipa de dois veterinários e um entomólogo durante a investigação de focos de Língua Azul ou Febre Catarral dos Ovinos; assisti à realização de inquéritos a produtores nas explorações; e à colocação de armadilhas para captura de culicídeos.

Toxoplasmose suína – no âmbito de outro projecto de investigação, colaborei na realização e na leitura de placas da prova de aglutinação directa para diagnóstico laboratorial desta doença parasitária.

Lince Ibérico – ajudei na validação de dados populacionais e assisti à análise de dados no programa SPSS dum estudo sobre parâmetros bioquímicos de referência do lince ibérico, *Lynx pardinus*.

1.5 Complementos de formação teórica

Assisti e participei nos seguintes seminários realizados no CreSA por investigadores do centro:

- “Hepatitis E virus infection dynamics in swine herds” por Maribel Casas Sanahuja (estudante de doutoramento);

- “Microarrays, pigs and Circovirus” por Joseane dos Santos (estudante de doutoramento);

- “Morfogenesis del virus de la Peste Suína Africana: estudios básicos y su aplicación al desarrollo de vacunas” por Maria Ballester Devis (estudante de doutoramento);

- “Prevalencia de influenza porcina, PRRS, PCV y enfermedad de Aujeszky en catalunya” por Sergio López Soria (estagiário de investigação e estudante de doutoramento).

Frequentei aulas de dois mestrados a decorrerem na Universidade Autónoma de Barcelona:

- módulo de **Gestión Sanitaria** do “Máster en Sanidad y Producción Porcina”;

- módulo de **Diagnòstic virològic en sanitat animal** do “Máster de Investigación en Veterinaria y Ciencias Alimentarias”.

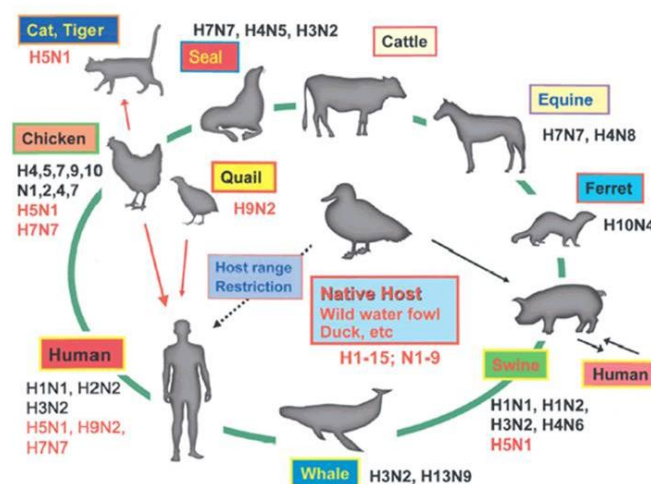
2. Introdução

A gripe é uma das doenças infecciosas com maior impacto na história da humanidade devido às pandemias ocorridas nos últimos 100 anos. A sua importância deve-se às características do vírus e à sua epidemiologia.

Os vírus influenza tipo A, capazes de infectar o Homem e os animais, apresentam, na actualidade, uma grande diversidade genética e antigénica devido a alterações produzidas por três mecanismos distintos: transmissão do vírus entre espécies, mutações e recombinação genética (Brown, 2002).

A transmissão entre espécies é favorecida pela diversidade de hospedeiros que o vírus infecta e pela grande interacção que existe, na natureza, entre o Homem, o porco, o cavalo, os mamíferos marinhos e as aves (Brown, 2002).

Figura 3 – Ecologia dos vírus influenza (<http://www.cdc.gov/>)



CDC (2005)

A capacidade referida de sofrer mutações e recombinações, aliada à grande facilidade de transmissão entre espécies susceptíveis e de dispersão geográfica, faz com que o aparecimento de um novo subtipo na população humana possa ocorrer de forma pandémica.

Até à data estão documentadas 3 pandemias provocadas por vírus influenza:

- gripe Espanhola, 1918, provocada pelo subtipo H1N1 clássico (responsável por 20-50 milhões de mortes);
- gripe Asiática, 1957, causada pelo subtipo H2N2;
- gripe de Hong Kong, 1968, devido ao subtipo H3N2.

Durante décadas, pensou-se que era sobretudo no porco que ocorriam as recombinações entre os vírus aviar e humano. Contudo, estudos recentes demonstraram que o papel do

porco como intermediário na geração de novos subtipos é mais limitado do que se pensava (Taubenberger, Reid, Janczewski & Fanning, 2001; Van Reeth, 2007).

Durante a revisão da primeira versão da dissertação, o aparecimento de um surto epidémico no Homem devido a uma nova estirpe do subtipo H1N1 fez com que fosse necessário suspender a correcção com o objectivo de acompanhar o desenvolvimento do surto.

Apesar da escassez de informação disponibilizada até ao momento, esta estirpe não parece ser de elevada virulência contando, neste momento, com 17 410 casos confirmados em 62 países e 115 mortes.

Apesar de ter sido designada de gripe suína, o primeiro isolamento desta estirpe no porco ocorreu após o contacto dos suínos com um trabalhador infectado. Este factor reporta-nos ao que aconteceu nas 3 pandemias do século XX, onde a disseminação ocorreu do Homem para o porco. Apesar de não terem sido activadas medidas de restrição à importação de animais, a monitorização da infecção nesta espécie é importante. A disseminação da infecção à população suína pode piorar o problema de saúde pública e neste caso as medidas relativas à importação serão reavaliadas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 História

O vírus influenza de origem suína foi descrito pela primeira vez no Verão de 1918, nos Estados Unidos, Hungria e China (Koen, 1919) quando foi detectada uma doença nos suínos, de carácter epidémico, com características clínicas e patológicas semelhantes à infecção por vírus influenza em humanos. A emergência desta doença coincidiu com a pandemia que, no mesmo ano, foi responsável pela morte de 20-50 milhões de pessoas em todo o mundo (Olsen, Brown, Easterday & Van Reeth, 2006). Koen (1919) denominou a doença de “gripe”, devido às semelhanças clínicas com a gripe no Homem.

A etiologia viral da doença seria confirmada por Shope em 1931 num estudo experimental (citado por Olsen *et al.*, 2006). Dois anos mais tarde, Smith *et al.* (1933) demonstraram que a mesma doença no Homem também tinha etiologia viral (citado por Olsen *et al.*, 2006). Shope (1936) afirmou que o vírus não circulava nos suínos antes de 1918 e que provavelmente se teria disseminado do Homem ao porco. Esta teoria foi bem acolhida pelos veterinários, que até à data da ocorrência, nunca tinham diagnosticado “gripe” nos suínos. No entanto, a relação entre as duas espécies na dinâmica da pandemia não foi demonstrada (Taubenberger *et al.*, 2001).

Actualmente, com recurso a estudos de sequenciação genética da hemaglutinina (HA), sabe-se que o agente causal de ambas as infecções foi um vírus do subtipo H1N1 que, provavelmente, derivou de um antecessor comum (Reid, Fanning, Hultin & Taubenberger, 1999; Brown, 2000).

Aquando da gripe Asiática (1957), um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), demonstrou que o subtipo H2N2, responsável pela pandemia também infectava os suínos. Em 1970, Olsen *et al.* (2006) demonstraram que pessoas que trabalhavam com suínos podiam-se infectar com o vírus influenza de origem suína.

O potencial zoonótico do vírus foi definitivamente confirmado em 1974, com o isolamento de um vírus influenza de origem suína no Homem (Smith, *et al.*, 1976).

Ao contrário do que aconteceu nos Estados Unidos, o vírus responsável pela pandemia de 1918 não permaneceu na população suína europeia. Nesta, o vírus H1N1 não foi detectado durante 20 anos, reaparecendo em 1976, no norte de Itália. Isolados deste vírus revelaram similaridade com o vírus circulante nos Estados Unidos (Nardelli, Pascucci, Gualandi & Loda, 1978 citado por Deu, 2004), pelo que a reentrada do H1N1 no continente europeu pode estar associada à importação de suínos reprodutores dos Estados Unidos. Posteriormente, o vírus disseminou-se rapidamente por toda a Europa e a infecção tornou-se endémica no continente (Brown, 2002).

O subtipo H3N2 foi introduzido na população suína europeia na década de 60 e estava geneticamente relacionado com a estirpe responsável pela pandemia de Hong Kong (1968)

(Brown, 2000; Loeffen, 2008). Mais tarde, uma recombinação entre a nova estirpe H1N1 de origem aviar e a estirpe de H3N2 circulante originou numa nova estirpe de H3N2 mais virulenta e responsável por surtos de Doença Respiratória Aguda em suínos. Esta estirpe tornou-se, na altura, a única a circular na população suína europeia.

Em 1987, o subtipo H1N2 foi isolado pela primeira vez na Europa. No entanto, não voltou a ser isolado até 1994, no Reino Unido (citado por Loeffen, Hunneman, Quak, Verheijden & Stegeman, 2009). Esta estirpe resultou de várias recombinações ('human like' H1N1 × 'human like' swine H3N2 × 'avian like' swine H1N1) e é a estirpe que circula actualmente. Este subtipo tornou-se endémico na população suína do Reino Unido e no final da década de 90 foi isolado na Bélgica, Itália, França, Alemanha e Espanha (idem).

Actualmente, os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 são endémicos na maior parte das explorações de suínos do mundo e continuam a ser responsáveis por prejuízos económicos na produção suína e constituem um problema de Saúde Pública (Olsen *et al.*, 2006).

Tabela 1 - Subtipos do vírus influenza tipo A endémicos nas populações de suínos

Subtipo	Local	Comentário
H1N1	América Norte	"Classical virus", isolado pela 1ª vez em 1930 na América do Norte.
	Europa	
	Ásia	
	América Sul	
	Europa	"Avian-like virus", isolado pela 1ª vez em 1979.
	Ásia	"Avian-like virus", isolado pela 1ª vez em 1993.
H3N2	Ásia	"Human-like virus", isolado pela 1ª vez em 1970 na Ásia.
	Europa	
	América Norte	
	América Sul	
	África	
	Ásia	"Avian-like virus", isolado pela 1ª vez em 1978.
H1N2	Ásia	"Classical/human-like" virus quimera (<i>reassortant</i>) no Japão.
	Europa	"Human/human-like" virus quimera (<i>reassortant</i>) no Reino Unido.

(adaptado de Brown, 2000)

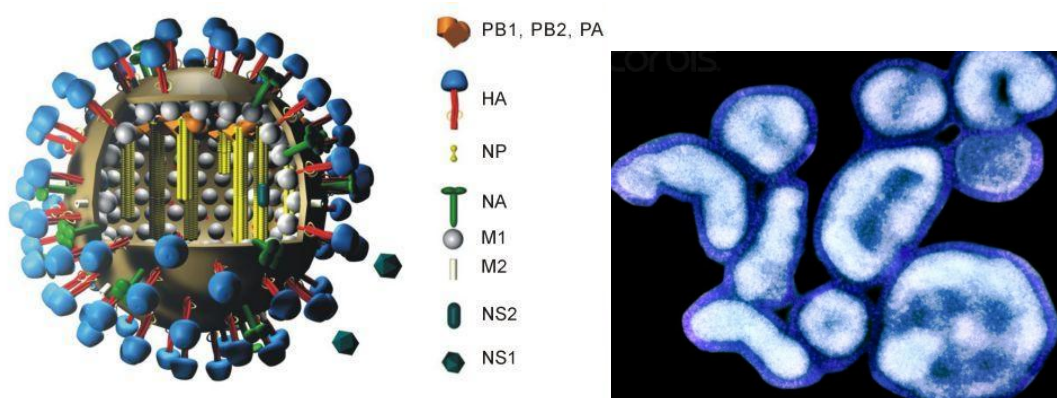
3.2 Etiologia

O vírus influenza é membro da família *Orthomyxoviridae*. É um vírus RNA de cadeia simples e de polaridade negativa (Olsen *et al.*, 2006). Apresenta forma esférica com um diâmetro aproximado de 80 a 120 nm. No entanto, as estirpes isoladas recentemente são pleomórficas, podendo conter partículas virais filamentosas (Carrasco & Río, 2006). O genoma viral é segmentado e codifica 8 ORFs distintas. As ORFs 1, 2 e 3 codificam para diferentes segmentos das transcriptases (PA, PB1 e PB2), a ORF4 codifica a HA, a ORF5 codifica a nucleoproteína (NP), a ORF6 codifica para a neuraminidase (NA), a ORF7 codifica a proteína de matriz (polipéptidos M1 e M2) e a ORF8 codifica a proteína estrutural (NS1) (Nakajima, 1997).

Figura 4 – Estrutura do virião

à esquerda, fotografia de modelo 3D (Loeffen, W. 2008)

à direita, micrografia electrónica x 65.000 (© Visuals Unlimited/Corbis, 2009)



Diferenças na M e nas NPs determinam o tipo do vírus. Sendo assim, existem três tipos de vírus Influenza: A, B e C. Só o vírus tipo A tem capacidade de infectar o Homem e os animais. Os tipos B e C infectam exclusivamente o Homem (Olsen *et al.*, 2006).

Os tipos de vírus clinicamente relevantes em Saúde Pública são os A e B. Os vírus de tipo A foram os responsáveis pelas pandemias registadas no século XX (Carrasco & Río, 2006).

Os vírus de tipo A classificam-se, ainda, em subtipos, de acordo com a natureza antigénica das suas glicoproteínas HA e NA (Carrasco & Río, 2006).

São conhecidas 16 formas diferentes de HA e 9 de NA que podem ser distinguidas antigénica e geneticamente. A combinação de HA e NA, num vírus, define o seu subtipo (Olsen *et al.*, 2006).

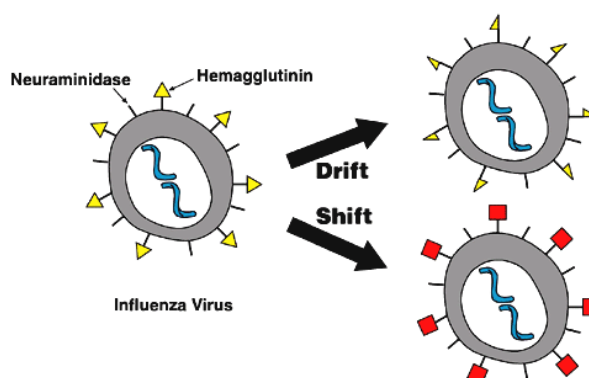
Quando observado ao microscópio electrónico, o vírus apresenta espículas à sua superfície que correspondem às proteínas externas: HA e NA.

Nas regiões distais das proteínas externas encontra-se o domínio proteico da HA que interage com os resíduos de ácido siálico da membrana celular, permitindo a infecção da

célula hospedeira (Carrasco & Río, 2006). Esta ligação ao ácido siálico é também responsável pela aglutinação dos eritrócitos, permitindo a detecção viral através da prova serológica de IH. Os anticorpos (Ac) neutralizantes são produzidos contra esta proteína, que é o maior antígeno viral (Olsen *et al.*, 2006).

A polimerase viral apresenta uma fidelidade de cópia relativamente baixa, o que permite o aparecimento de mutações que originam o fenómeno de *antigenic drift* que gera pequenas alterações antigénicas. Por outro lado, quando há coinfeção por diferentes subtipos num indivíduo, a segmentação do genoma permite o surgimento de novos subtipos por recombinações dos genes HA e NA, conduzindo a alterações antigénicas maiores, designadas por *antigenic shift*, responsável pelas pandemias de gripe (Carrasco & Río, 2006; Hampson & Mackenzie, 2006). O fenómeno de *antigenic drift* ocorre com maior frequência no Homem. No entanto, pode surgir em suínos, principalmente em leitões com anticorpos de origem materna (AcM) e em reprodutoras que vivem o tempo suficiente para se poderem infectar várias vezes com o mesmo subtipo (Loeffen, Heinen, Bianchi, Hunneman & Verheijden, 2003a).

Figura 5 – *Antigenic Shift* e *Antigenic Drift* (Medical Encyclopedia, 2009)



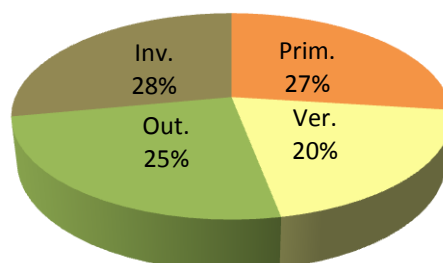
Os vírus influenza que infectam os mamíferos são relativamente lábeis. A sua sobrevivência no meio ambiente depende da temperatura, do pH, da salinidade do meio e da presença de material orgânico. Podem persistir aproximadamente 2 horas em fomites e são inativados pelo calor (56 °C durante 30 minutos), pH ácido (pH=3), por solventes de lípidos e por desinfetantes (hipoclorito de sódio, etanol 70%, agentes oxidantes, compostos de amónio quaternário, aldeídos, fenóis, ácidos e iodopovidona).

3.3 Epidemiologia

Choi, Goyal & Joo (2003) consideraram que a infecção por vírus influenza evoluiu duma ocorrência epidémica sazonal para um perfil endémico. A alteração do sistema de produção com o total confinamento dos animais, associado a elevadas taxas de refugo e de reposição e à aquisição de suínos susceptíveis (não vacinados) contribuiu para que a doença se manifeste durante todo o ano (Gráfico 1) (Brown, 2002; ESNIP1, 2001-2003; ESNIP2, 2006-

2008). Implementar práticas de *all in/all out* é uma boa estratégia pois dificulta a permanência do vírus nos pavilhões devido à combinação de despopulação e de desinfecção e vazio sanitário (Olsen *et al.*, 2006; Harris, 2000).

Gráfico 1 – Prevalência do vírus influenza por estação do ano (ESNIP2, 2006-2008)



Uma doença de ocorrência endêmica que evolui em populações susceptíveis (não vacinadas), se exposta a factores determinantes de doença associados ao ambiente como baixas temperaturas ou manejo deficiente, ou por factores determinantes de doença associados ao hospedeiro como infecções concomitantes, pode exibir picos epidêmicos (Brown, 2000).

Um rastreio serológico realizado na Bélgica em 2003, revelou que 48% das reprodutoras apresentavam anticorpos para dois subtipos e 31% apresentavam anticorpos para três subtipos, o que sugere que pode haver infecção simultânea durante toda a vida produtiva do animal (Van Reeth, 2007) com o risco inerente de recombinações genéticas (Brown, 2002).

Os subtipos mais frequentes na população suína na Europa são o H1N1, H1N2 e o H3N2. Porém, têm sido isolados outros subtipos por todo o mundo: por exemplo, H9N2 e H5N1 na Ásia (Haiyan *et al.*, 2004) e H4N6 e H3N3 no Canadá (Karasin *et al.*, 2000; Karasin, West, Carman & Olsen, 2004).

Cada subtipo pode ser classificado em diferentes estirpes que são denominadas de acordo com a seguinte regra (Deu, 2004):

tipo de vírus /espécie onde foi isolado / local / nº sequencial / ano de isolamento.

Exemplo: **A/Swine/Wisconsin/125/98** (Olsen *et al.*, 2006).

Deu (2004) referia que, a nível mundial, aproximadamente 60% dos surtos epidêmicos eram causados pelo subtipo H1N1 e 40% pelo subtipo H3N2. Contudo, nos últimos anos, um pouco por todo o mundo, registou-se um aumento da prevalência de estirpes do subtipo H3N2.

Pretendemos na Tabela 2 enfatizar que os vírus que circulam actualmente na Europa e nos Estados Unidos da América apresentam características genéticas diferentes, apesar de pertencerem ao mesmo subtipo (Thacker & Janke, 2008). Estas diferenças têm implicações

quer no diagnóstico quer na prevenção/controlo, pois as estirpes usadas como imunogénios nas vacinas e como antigénios nos testes de diagnóstico têm que variar nestes continentes (Van Reeth, 2007).

Tabela 2 – Diferenças de subtipos entre continentes

Europa	Estados Unidos da América
H1N1 “ <i>Avian like</i> ”	“ <i>Classical</i> ” H1N1
Substituiu “ <i>classical swine</i> ”	Prevalente nos E.U.A. e outros países
Muito relacionado com o H1N1 dos patos	Origem humana por contacto
H3N2 “ <i>human-like</i> ”	H3N2 humano/aviar/porcino
	Várias linhagens por transmissões contínuas
H1N2	H1N2
H1N1 Homem	“ <i>classical swine</i> ” H1N1
H3N2 “ <i>human like</i> ”	H3N2 humano/aviar/porcino
H1N1 “ <i>avian like</i> ”	

(adaptado de Maldonado, 2007)

A infecção por vírus influenza tipo A é específica de cada espécie sendo que a transmissão do vírus entre espécies susceptíveis é um evento raro (Van Reeth, 2007). De facto, um estudo realizado por Kulken *et al.* (2006) demonstrou que existem vários factores que limitam essa transmissão, nomeadamente a ausência de receptores específicos na célula hospedeira. Desta forma, o vírus de outra espécie animal não consegue aderir à célula hospedeira. Para que o vírus se adapte e se torne infectante, necessita sofrer alterações genéticas nas suas proteínas virais (Van Reeth, 2007; Suwannakhon *et al.*, 2008). Além da ocorrência de mutações, a aquisição de patogenicidade depende da condição imunitária do hospedeiro, da capacidade de adaptação do vírus, da sua transmissibilidade, do tropismo para os tecidos e da sua eficiência de replicação (Taubenberger *et al.*, 2001).

3.3.1 Pandemiologia

O reservatório natural dos vírus influenza tipo A são as aves, em particular os anatídeos selvagens, que são infectadas de forma assintomática e persistente. No entanto, os subtipos H5 e H7 podem causar mortalidades elevadas nas aves selvagens (Hampson & Mackenzie, 2006).

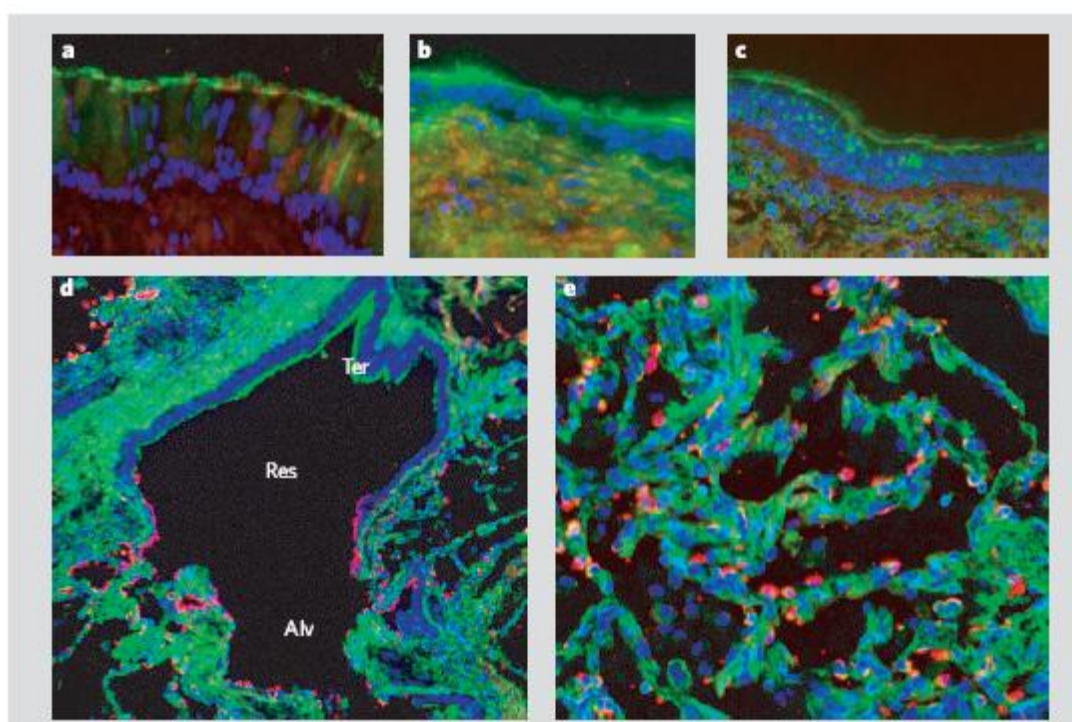
O vírus multiplica-se no trato gastrointestinal, é excretado sobretudo nas fezes, podendo ser isolado em águas frequentadas por bandos infectados. A transmissão é feita por via fecal-oral (Sturm-Ramirez *et al.*, 2004; Katz *et al.*, 2009). Estes factores, associados às características gregárias e migratórias destas espécies, facilitam a circulação e a dispersão geográfica do vírus. Enquanto os vírus influenza que se estabeleceram nos mamíferos

apresentam um número limitado de subtipos, nas aves já foram isoladas 82 combinações diferentes (Van Reeth, 2007). Ao contrário do que acontece nas aves, nos mamíferos predominam subtipos específicos de cada espécie. Por exemplo, no Homem predomina actualmente a HA de tipo 3 (H3), no cavalo predominam a H3 e a H7 e nos suínos predominam a H1 e a H3. Apesar do carácter zoonótico da infecção por vírus influenza tipo A e da possível transmissão de vírus aviáres ao Homem, o fenómeno não é simples nem frequente (Van Reeth, 2007). A transmissão do vírus entre espécies depende da afinidade da HA viral para o seu receptor celular no novo hospedeiro. Para que o vírus consiga infectar a célula tem que se ligar a receptores constituídos por moléculas de ácido siálico ligadas a galactose (Olsen *et al.*, 2006; Van Reeth, 2007). Estas moléculas podem apresentar duas configurações: α -2,3 e α -2,6. Os vírus aviáres têm maior afinidade para os receptores de configuração α -2,3; os vírus humanos para os receptores α -2,6; os vírus de origem suína apresentam igual afinidade para ambos os receptores (Shinya *et al.*, 2006; Jung, Song, Kang, Oh & Park, 2007; Van Reeth, 2007). Por este motivo, se pensou durante muitos anos, que o porco era um pivot importante na transmissão de vírus de origem aviar ao Homem. Contudo, estudos recentes demonstraram que o Homem tem receptores para os vírus influenza humano e aviar localizados respectivamente no tracto respiratório superior e inferior (Shinya *et al.*, 2006) (Figura 6). De facto, alguns subtipos aviáres denominados HPAI (*highly pathogenic avian influenza*) podem ser transmitidos directamente ao Homem. Exemplos recentes são a epidemia causada pelos subtipos H9N2 em Hong Kong em 1999 (Webby & Webster, 2001); pelo H5N1 em Hong Kong em 2003 e pelo H7N7 na Holanda em 2003 (De Jong & Hien, 2006).

Concluindo, o papel do porco como intermediário é mais limitado do que se pensava, e o vírus influenza aviar pode ser transmitido ao Homem sem intervenção do porco.

Durante a primeira revisão da dissertação, o aparecimento de um surto epidémico no Homem provocado por uma nova estirpe do subtipo H1N1 de origem desconhecida e com sequências genéticas de vírus das aves, do porco e do Homem (Centres for Disease Control and Prevention [CDC], 2009) veio levantar de novo a questão da importância do porco na geração de novos vírus. Este surto foi desde o início denominado de "gripe suína", contudo o papel do porco no desenvolvimento do surto epidémico não ficou demonstrado até ao momento.

Figura 6 – Reactividade de tecido respiratório humano a lectinas específicas para diferentes ligações ao ácido siálico (Shinya *et al.*, 2006)



Reactividade do tracto respiratório humano com lectinas específicas para diferentes ligações de ácido siálico. a) mucosa nasal; b) seios paranasais; c) brônquios; d) bronquíolos; e) alvéolos. Res, bronquíolo (adjacente aos alvéolos); Ter, bronquíolo terminal (distal ao alvéolo); Alv, alvéolo. Verde, reacção com lectina *Sambucus nigra*, indicador da presença de ácido siálico ligado à galactose em $\alpha 2,6$ (SA $\alpha 2,6$ Gal). Vermelho, reacção com lectina *Maackia amurensis*, indicador da presença de SA $\alpha 2,3$ Gal. As células foram coradas com DAPI (4,6-diamidino-fenilindol).

3.3.1.1 Transmissão entre o porco e o Homem

A maioria das infecções por vírus influenza de origem suína no Homem não se distinguem das infecções causadas por vírus da gripe humana. Ambas são caracterizadas por elevadas taxas de morbilidade e baixas taxas de mortalidade, embora estejam publicados casos fatais associados a infecção pelo “classical” H1N1 (Van Reeth, 2007). Um exemplo foi o surto epidémico de 1976, em Fort Dix, Jersey, que afectou um centro de treino das Forças Armadas norte-americanas. Este foco foi provocado pelo subtipo H1N1 clássico, de origem suína, e causou uma morte e treze hospitalizações. A investigação subsequente revelou que 230 soldados tinham sido infectados ou expostos ao vírus. Contudo, nunca foi provado que os suínos eram a origem do vírus (Gaydos *et al.*, 1977 revisto em Lessler, Cummings, Fishman, Vora & Burke, 2007). Apesar da maior parte dos casos de infecção de humanos por vírus de origem suína estarem relacionados com exposição ao subtipo H1N1, foram reportados dois casos de infecção em crianças pelo subtipo H3N2 de origem aviar na Holanda em 1993 (Brown, 2000).

Desde então, vários estudos têm demonstrado que pessoas que mantêm contactos frequentes com suínos apresentam títulos elevados de anticorpos. Porém, os casos de doença por vírus influenza de origem suína e a sua disseminação na população humana são raros (Van Reeth, 2007).

3.3.1.2 Transmissão entre o porco e as aves

Além da transmissão entre homem e porco, o vírus de origem suína tem sido isolado em perus, indicando transmissão entre porcos e aves. Na Europa, o subtipo H1N1 de origem aviar já adaptado aos suínos, foi reintroduzido na população de perus provocando perdas económicas (Halvorson *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 2004c).

Em 1999, o subtipo H9N6 invadiu a população de suínos asiática a partir de aves infectadas, e desde então, tem sofrido alterações genéticas consideráveis. Pelo menos 6 estirpes já foram isoladas em suínos e um surto epidémico provocado por este subtipo, foi responsável em 2003 por elevada morbidade e baixa mortalidade (Peiris *et al.*, 2001; Cong *et al.*, 2007). O subtipo aviar de alta patogenicidade H5N1 foi isolado pela primeira vez em aves selvagens mas há registo de infecção de gatos, porcos, Homem e outros mamíferos (Lipatov *et al.*, 2008). Este subtipo tem sido associado a elevadas taxas de mortalidade em aves selvagens e até 21 de Abril de 2009 foi responsável por 257 mortes no Homem (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_04_21/en/index.html).

No porco foram isoladas seis estirpes do subtipo H5N1, evoluindo todas de forma assintomática ou com sintomatologia ligeira. Ao contrário do que sucede nas aves, o subtipo H5N1 não se replica eficazmente no porco. Fá-lo unicamente no tracto respiratório, sem evidência de infecção sistémica (Lipatov *et al.*, 2008). A transmissão entre suínos não é eficaz. Por isso, o vírus não teve capacidade de adaptação e acabou por extinguir-se na população suína. A infecção de ambas as espécies pelo subtipo H5N1 ocorreu por contacto directo com aves infectadas. Um estudo experimental realizado por Lipatov *et al.* (2008) induziu infecção subclínica em porcos através da ingestão de carne de frango infectada com elevados títulos de vírus (10^{10} EID₅₀/animal) (Lipatov *et al.*, 2008).

3.4 Sinais clínicos

O vírus influenza suíno é um agente patogénico primário, ou seja, tem capacidade de provocar doença e lesão pulmonar por si só. Não existe diferença no grau de virulência entre os três subtipos virais cocirculantes e todos eles são capazes de induzir Doença Respiratória Aguda (ESNIP 2, 2006-2008).

A gripe suína caracteriza-se pelo aparecimento repentino de sintomas após um período de incubação de 1-3 dias. Contudo, o foco pode prolongar-se por várias semanas à medida que o vírus se transmite de animal a animal, dentro da exploração. Os sintomas mais frequentes

são febre, anorexia, prostração, corrimento nasal, tosse e dispneia. Pode também observar-se conjuntivite e perda de peso (Olsen *et al.*, 2006).

A severidade da doença depende de factores como a idade do animal, o seu estado de saúde e o seu estatuto imunitário; a estirpe do vírus; e a ocorrência de coinfeções bacterianas ou virais. A mortalidade é baixa ($\approx 1\%$), mas a morbilidade pode atingir os 100% (Olsen *et al.*, 2006).

A recuperação evolui de forma rápida, geralmente, com início 5 a 7 dias após o aparecimento dos sintomas.

A ocorrência de infecções subclínicas é muito frequente. A maioria dos animais infecta-se com um ou mais subtipos virais, sem nunca manifestar sintomas, devido à elevada eficácia da resposta imunitária humoral e celular do hospedeiro, como adiante será detalhado. Neste grupo, estão também incluídos os leitões com anticorpos de origem materna (AcM). Esta variação individual é referida por Van Reeth (2007) como consequência da condição imunitária de cada animal, uma vez que o desenvolvimento da doença é causado pela libertação de mediadores inflamatórios aquando da chegada do vírus aos pulmões.

Além dos sintomas respiratórios, a infecção por vírus influenza pode ainda resultar na diminuição da performance reprodutiva, em aborto, nascimento de leitões fracos e nados mortos (Olsen *et al.*, 2006; Deu, 2004). Porém, não está demonstrado que o vírus influenza seja, por si só, responsável por problemas reprodutivos (Brown, 2002; Olsen *et al.*, 2006). De facto, vários autores reportam a sua associação com o arterivírus responsável pela síndrome PRRS (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2003). Também foram realizados vários estudos que avaliam o possível envolvimento do vírus influenza na Doença Respiratória Aguda (Deu, 2004; Nakharuthai *et al.*, 2008).

3.4.1 Doença Respiratória Aguda

A Doença Respiratória Aguda tem etiologia multifactorial e a gravidade dos sintomas/lesões é determinada pelos agentes envolvidos, por factores ambientais, práticas de manejo e pela resposta imunitária do hospedeiro (Choi, Sagar & Joo, 1988; Van Reeth, Nauwynck & Pensaert, 1996; Loeffen *et al.*, 1999). A fase do ciclo de produção mais afectada é o início da engorda que coincide com a depuração dos AcM e a exposição aos agentes patogénicos (Choi *et al.*, 1988; Van Reeth *et al.*, 1996; Loeffen *et al.*, 1999; Gutiérrez-Martín *et al.*, 2000).

A Doença Respiratória Aguda resulta do sinergismo entre agentes primários virais e bacterianos e pela infecção secundária por diversos agentes bacterianos.

Os principais vírus envolvidos são o vírus influenza, o vírus da Doença de Aujeszky, o arterivírus (PRRS) e o coronavírus. Os agentes primários bacterianos são o *Mycoplasma hyopneumoniae*, responsável pela pneumonia enzoótica e o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, responsável pela pleuropneumonia. O agente secundário mais importante é a bactéria *Pasteurella multocida*. No entanto, outros agentes como *M.*

Hyorhinis, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica* podem estar envolvidos (Choi *et al.*, 1988; Van Reeth *et al.*, 1996; Loeffen *et al.*, 1999; Gutiérrez-Martín *et al.*, 2000). Têm sido demonstradas várias interações entre agentes, por exemplo: vírus da Doença de Aujeszky e *Pasteurella multocida*, PRRS e *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRS e vírus influenza (Choi *et al.*, 1988). Em todas as interações descritas a gravidade da doença estava aumentada em comparação com a infecção de cada um destes agentes individualmente (Van Reeth *et al.*, 1996, Gutiérrez-Martín *et al.*, 2000).

O vírus influenza tem sido referido como um dos agentes mais importantes no desenvolvimento da Doença Respiratória Aguda (Van Reeth *et al.*, 1996). Estudos recentes demonstraram que estava presente em 50% dos casos de doença (Loeffen *et al.*, 1999), sendo em 88% dos casos em associação com o PRRS (Choi *et al.*, 1988).

A existência de infecções multifactoriais, principalmente em sistemas de produção intensivos complicam a aplicação de programas de erradicação e de planos de tratamento (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2000).

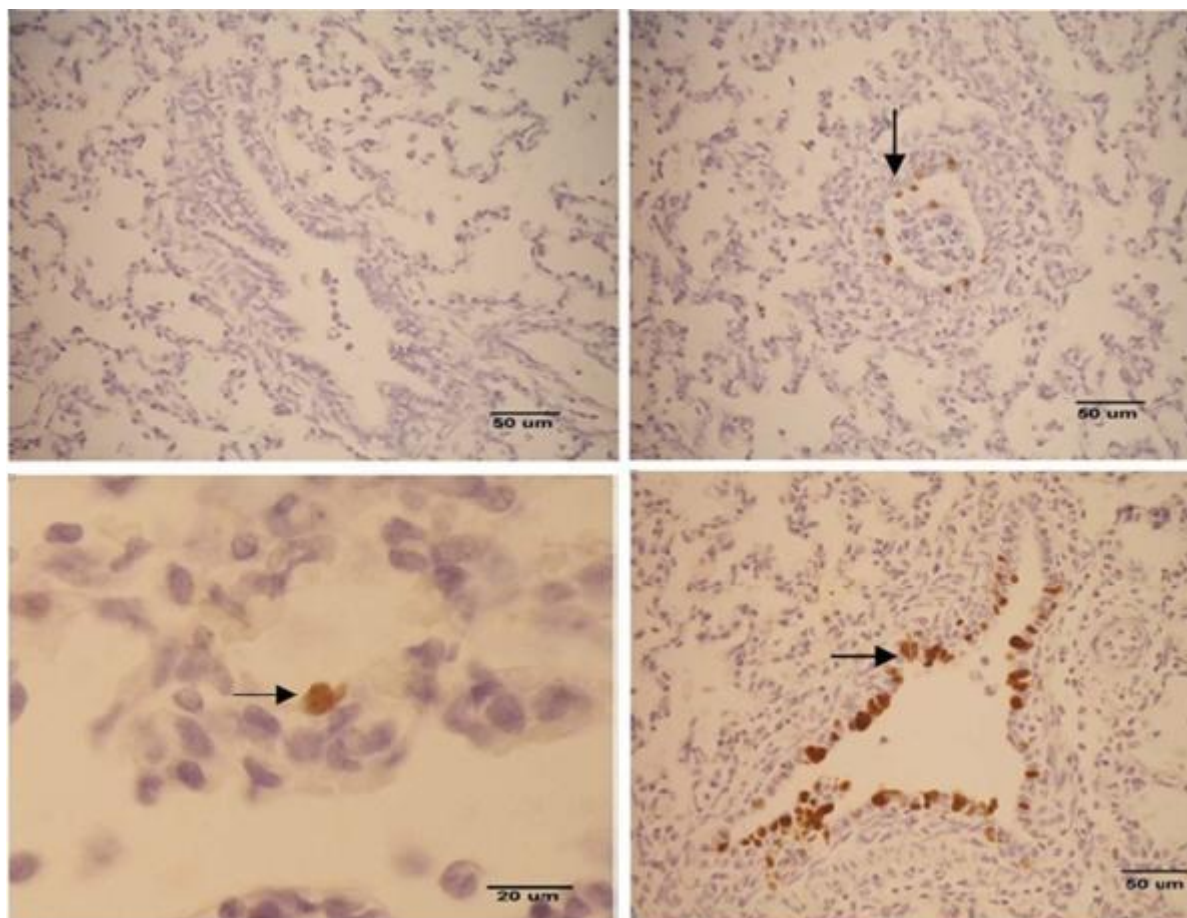
3.5 Patogenia

A infecção pelo vírus Influenza tipo A nos suínos está geralmente limitada ao trato respiratório. A replicação viral efectua-se nas células da mucosa nasal, tonsilas, traqueia, pulmões e nos linfonodos traqueobrônquicos (ESNIP2, 2006-2008). A virémia, por ser de curta duração e com baixos títulos de vírus, raramente é detectada (Choi, Goyal & Joo, 2004b). Estudos de imunofluorescência e imunohistoquímica demonstraram que as células epiteliais bronquiolares e alveolares são as mais afectadas (ESNIP2, 2003-2008). A resposta imunitária provoca um fluxo de neutrófilos para os pulmões que é responsável pela obstrução das vias aéreas e pela lesão pulmonar. Apesar das proteínas virais NA e PB1 provocarem lesão directa das células por apoptose (Gibbs, Malide, Hornung, Bennick & Yewdell, 2003), está provado que os principais intervenientes no desenvolvimento de doença, são as citocinas libertadas pelas células inflamatórias (Van Reeth, Van Gucht & Pensaert, 2002).

Estudos experimentais demonstraram que o animal excreta o vírus pela cavidade nasal aproximadamente 24 horas após a inoculação (PI), durante 7 dias. Desta forma, o vírus deixa de poder ser isolado dos pulmões ou de outro tecido do trato respiratório, sete dias PI (Choi *et al.*, 2004b).

A infecção é simulada experimentalmente recorrendo a várias vias de inoculação do vírus. Contudo, a via que permite obter quadros sintomatológico e lesionais mais próximos da realidade, é a inoculação intratraqueal. (Maes *et al.*, 1984 revisto em Olsen *et al.*, 2006).

Figura 7 – Epitélio respiratório de suíno infectado experimentalmente com vírus influenza (Streta *et al.*, 2009)



Vírus influenza suíno (Imunohistoquímica), (A) controlo negativo, (B) controlo positivo com células coradas de castanho escuro (seta), (C) vírus influenza em células epiteliais bronquiolares e (D) células epiteliais alveolares.

3.6 Resposta Imunitária

A resposta imunitária induzida pelo vírus Influenza é extremamente eficiente e rápida e resulta na completa eliminação do vírus em aproximadamente 1 semana PI (Olsen *et al.*, 2006). A resposta induzida é tanto humoral como celular. Na resposta humoral são produzidos títulos elevados de Ac frente às proteínas M1, NP, HA e NA. Os Ac que são produzidos contra a HA são neutralizantes; os produzidos contra a NA contribuem apenas parcialmente para a protecção. A resposta neutralizante é específica do subtipo e dentro que cada subtipo dirige-se especialmente a uma estirpe em particular. Em geral, existe uma correlação positiva entre o título de Ac anti-HA e anti-NA e o nível de protecção que um indivíduo apresenta face a uma estirpe viral específica (Carrasco & Río, 2006).

Os Ac podem ser detectados a partir dos 7-10 dias PI, por técnicas como a neutralização viral (NV) ou a IH. O pico de produção de Ac ocorre às 2-3 semanas PI e começam a decair às 8-10 semanas (Olsen *et al.*, 2006). As IgM são os primeiros Ac a serem produzidos,

seguindo-se a produção de IgG. As IgA são o principal isótipo detectado nas lavagens nasais (Heinen *et al.*, 2000).

A resposta celular consiste, essencialmente na produção de linfócitos T e é dirigida contra uma grande variedade de antígenos virais, que incluem a NP, M1, PB2 e NS1. Esta resposta produz mais reacções cruzadas do que a resposta humoral e pode abarcar vários subtipos do vírus (Heinen, Van Nieuwstadt, Boer-Luijtz & Bianchi, 2001; Tamura, Tanimoto & Kurata, 2005). Ao contrário da resposta humoral, não há associação entre o nível de resposta celular e o grau de protecção do animal. Contudo, esta resposta é essencial na recuperação da infecção, mediante a eliminação do vírus do organismo (Carrasco & Río, 2006).

As citocinas envolvidas na resposta imunitária são: interferão- α (IFN α), factor de necrose tumoral (TNF α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas são responsáveis pelo desenvolvimento da doença, e o seu pico de produção coincide com os sinais de dor, perda de apetite e inflamação, que geralmente surgem 24 horas após a inoculação intratraqueal do vírus. O pico de produção de citocinas coincide com o pico de replicação viral. Desta forma, qualquer factor que iniba a replicação viral será capaz de prevenir a ocorrência de episódios clínicos de doença (Van Reeth, 2007).

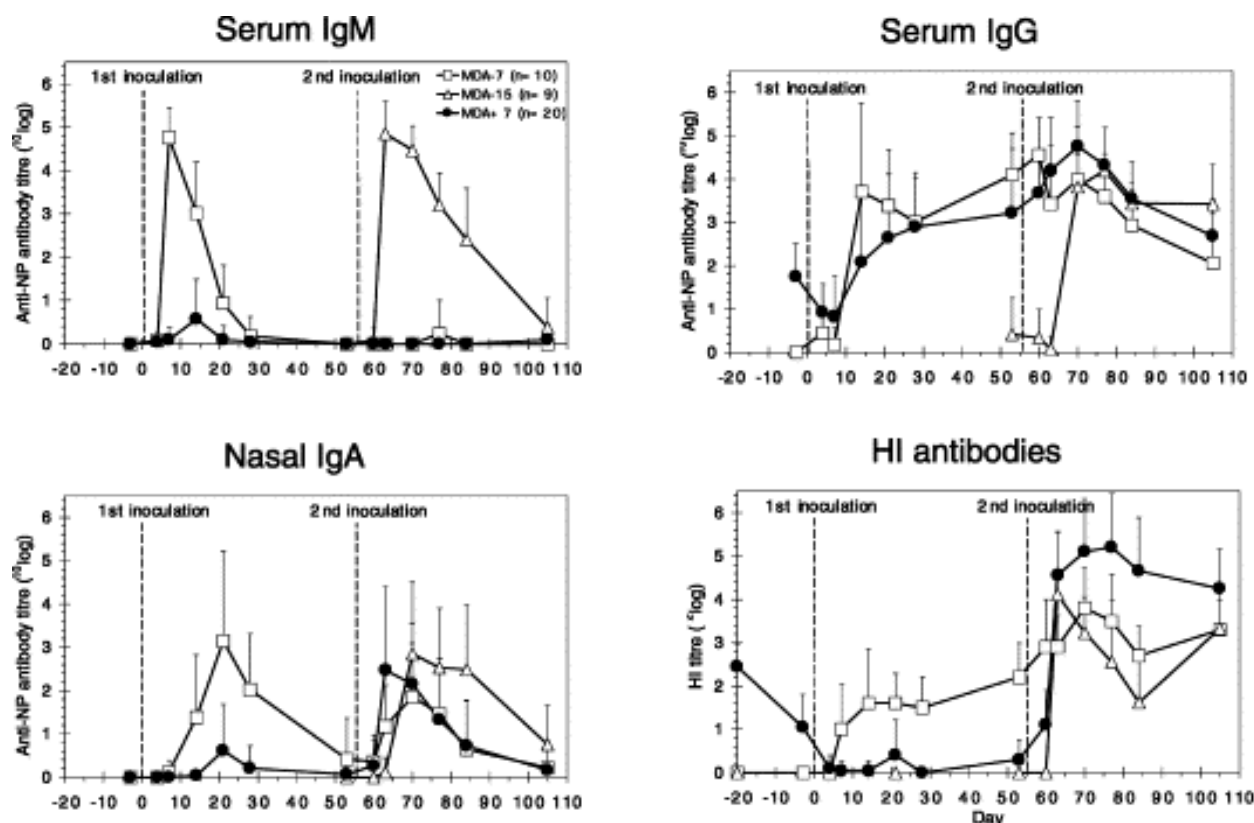
3.6.1 Imunidade de origem materna

Os leitões que nascem de reprodutoras imunes (vacinadas ou infectadas) encontram-se parcialmente protegidos contra a infecção durante as primeiras 7 a 8 semanas de vida e geralmente não desenvolvem a doença. A infecção dos leitões ocorre maioritariamente após as 10 semanas de idade (Loeffen, 2008).

Os Ac de origem materna (AcM) são principalmente IgG e protegem os pulmões contra a invasão e replicação viral (Loeffen *et al.*, 2003a). No entanto, a resposta imunitária é variável. Por isso iremos analisar vários estudos experimentais realizados no âmbito da protecção dos leitões com AcM mas onde diferenças no desenho experimental conduziram a divergências de resultados. De facto, Renshaw (1975) afirmou que a protecção depende do título de AcM e alguns autores demonstraram que existe protecção parcial dos leitões (Blaskovic, Rathova, Skoda, Kociskova & Kaplan, 1970) enquanto outros não evidenciaram níveis de protecção (Mensik, Pospisil, Franz & Dreslerova, 1971a; Mensik, Valicek & Pospisil, 1971b). Estudos recentes demonstraram que animais infectados na presença de AcM apresentavam um ligeiro aumento na temperatura corporal, atraso no crescimento e aumento na excreção viral em comparação com animais susceptíveis (Kitikoon *et al.*, 2006; Loeffen *et al.* 2003a). Estes resultados demonstraram que, apesar de protegidos, a resposta humoral neste grupo de animais está diminuída. No entanto, apenas a resposta dirigida para a HA é inibida pois a resposta anti-NP permanece normal (figura 6). A NP é uma proteína interna e desta forma inacessível aos AcM (Loeffen *et al.*, 2003a).

Estudos anteriores provaram que a presença de AcM não interfere com o estabelecimento da imunidade celular. As diminuições de linfócitos T no sangue periférico observadas num estudo experimental, ocorreram principalmente em animais com baixa imunidade humoral e deveram-se à deslocação destes para os pulmões (figura 6) (Loeffen et al., 2003a).

Figura 8 – Influência dos AcM na resposta imunitária dos leitões (adaptado de Loeffen et al., 2003a)



Títulos de IgM e IgG anti-nucleoproteína no soro, IgA anti-nucleoproteína na mucosa nasal e Ac anti-hemaglutinina no soro de animais com 7 e 15 semanas de idade PI com o subtipo H1N1. Os grupos MDA+7 e MDA-7 eram MDA+ e MDA- respectivamente e foram inoculados às 7 semanas de idade. O grupo MDA-15 era MDA negativo e foi inoculado às 15 semanas de idade. MDA, anticorpos de origem materna.

3.6.2 Imunidade cruzada

Vários estudos experimentais têm sido realizados com o objectivo de avaliar a ocorrência de protecção cruzada entre subtipos do vírus influenza (Van Reeth, De Clercq & Pensaert, 2001; Van Reeth, Brown, Essen & Pensaert, 2004a). Ambos os estudos realizados por Van Reeth et al. (2001, 2004a) demonstraram que animais previamente infectados com um dos subtipos H1N1 ou H3N2 continuam susceptíveis à infecção por H1N2, embora a excreção viral nas secreções nasais estivesse diminuída. Este resultado sugere a existência de protecção parcial entre os dois subtipos. O estudo experimental desenvolvido em 2004 (Van Reeth et al.) teve como objectivo determinar o grau de protecção para o subtipo H1N2 em

animais previamente infectados com ambos os subtipos: H1N1 e H3N2. A ausência de excreção viral nas secreções nasais, de lesões pulmonares ou de sinais clínicos PI, demonstrou completa protecção para o subtipo H1N2. No entanto, este cenário não se observa em suínos vacinados. A ausência de protecção cruzada após a vacinação e a ausência de reacções cruzadas na IH sugerem que os Ac contra a HA não são essenciais para a protecção cruzada, provavelmente dependente da resposta imunitária celular ou de imunidade das mucosas (Van Reeth et al., 2001, 2004a).

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da gripe suína apenas pode ser realizado de forma presuntiva, pois não existem sinais patognomónicos da doença e podem ocorrer infecções subclínicas (Brown, 2002). O diagnóstico definitivo é realizado *in vivo* por detecção do vírus nas secreções nasais ou faríngeas e *post-mortem* no tecido pulmonar. Como a replicação viral ocorre apenas 5 a 7 dias PI, as amostras para isolamento viral devem ser colhidas durante a fase aguda da doença (ESNIP2, 2006-2008). O isolamento viral é efectuado em ovos de galinha embrionados ou em diversas linhas celulares (OIE, 2004).

O recurso a testes serológicos é muito útil pois os Ac anti HA apresentam pico de produção às 2-3 semanas PI e começam a decair aos 3-6 meses PI (ESNIP2, 2006-2008). Como estes testes detectam anticorpos específicos contra o vírus, o reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) é necessário para identificar a estirpe viral (Yoon, Janke, Swalla & Erickson, 2004).

Existem vários testes serológicos disponíveis, nomeadamente: IH, NV, imunofluorescência directa (IFD), imunodifusão em agar gel e ELISA (OIE, 2004; Yoon et al., 2004). O teste mais utilizado é a IH, pois é o teste recomendado pelo Office International des Épizooties (OIE) e usado internacionalmente para certificar a ausência de doença em lotes de suínos vivos destinados à exportação. Este teste é específico para o subtipo, uma vez que detecta anticorpos produzidos contra a proteína de membrana HA. As análises são realizadas em separado para cada subtipo e são utilizadas estirpes de H1N1, H1N2 e H3N2 como Ag. A sensibilidade do teste depende das características antigénicas da estirpe utilizada. Assim a sensibilidade é tanto maior quanto maior for a semelhança entre a estirpe utilizada e a estirpe circulante (ESNIP2, 2006-2008). A IH permite a identificação do vírus e a medição do título de anticorpos, baseando-se para este efeito, na capacidade que o vírus tem para aglutinar eritrócitos (Wright, Neumann & Kawaoka, 2007). A interpretação dos resultados pode ser complexa quando um animal está infectado por vários subtipos em simultâneo. Por exemplo, a inoculação experimental de H1N2 num animal previamente infectado com o subtipo H1N1 vai promover um grande aumento dos Ac já existentes para H1N1 (Van Reeth et al., 2004a).

Para se confirmar um caso de infecção aguda por vírus influenza devem ser colhidas duas amostras de soro, uma durante a fase aguda da doença e outra 2-3 semanas depois. Se a infecção for causada por vírus influenza o primeiro soro não terá Ac e o segundo terá títulos elevados de Ac contra o subtipo infectante (Van Reeth et al., 2004a)

Apesar de não ser muito dispendioso, a IH é um teste laborioso e moroso que requer diluições seriadas das amostras de soro, preparação dos reagentes, standardização do vírus e leitura manual das placas (Skibbe, Zhou & Janke, 2004). Para superar estas limitações têm sido desenvolvidos kits ELISA que permitem acelerar o diagnóstico (Yoon et al., 2004). Estes kits são cruciais para a vigilância epidemiológica da doença (Bai et al., 2005).

Um estudo realizado por Yoon et al. (2004) comparou um ELISA comercial para H1N1 com a IH. Apesar de o ELISA ter uma elevada especificidade (100%), apresentava uma sensibilidade de apenas 58%, além de diagnosticar apenas um subtipo. De facto, o ELISA revelou dificuldade em detectar estadios precoces da infecção principalmente quando o vírus invade uma população susceptível sem exposição prévia. Aparentemente, os anticorpos detectados pelo ELISA desenvolvem-se mais lentamente que os anticorpos detectados pela IH. Este último teste detectou anticorpos a partir do 7º dia PI, enquanto o ELISA detectou anticorpos em 0%, 75% e 100% dos animais infectados nos dias 7, 14 e 28 PI, respectivamente.

Porém, outro estudo, realizado por Skibbe et al. (2004), demonstrou que o ELISA e a IH apresentam cerca de 82,8-86,7% de concordância na detecção de anticorpos para o vírus influenza suíno.

A discrepância de resultados observada nestes estudos parece estar relacionada com o isótopo detectado por cada teste. O ELISA detecta principalmente IgG, incluindo as de origem materna (Skibbe et al., 2004), enquanto a IH detecta os anticorpos IgM e IgG (Skibbe et al., 2004; Yoon et al., 2004). A IH consegue detectar Ac de origem materna, embora revele dificuldades quando os títulos são $\leq 1:40$. Estes títulos baixos podem também ser confundidos com reacções inespecíficas que interferem com o teste (Skibbe et al., 2004).

A IDEXX desenvolveu um ELISA que permite detectar títulos de anticorpos baixos a moderados. Este teste é mais sensível que a IH na detecção de títulos baixos de Ac de origem materna (Fleck & Behrens, 2002), o que ajuda a determinar a altura ideal para revacinar.

Mais recentemente, o programa de vigilância europeu para o vírus influenza suíno (The European surveillance network for influenza in pigs) com o apoio dos laboratórios Hipra S.A. (Girona, Espanha) desenvolveu um ELISA com o objectivo de melhorar o diagnóstico de infecções por vírus influenza suíno. Este kit apresenta uma especificidade de 100% e sensibilidades de 100%, 86,9% e de 73,4% para os subtipos H1N1, H3N2 e H1N2 respectivamente (Maldonado, 2007). Além da elevada sensibilidade, o kit ELISA tem ainda

as seguintes vantagens sobre a IH: análise de um grande número de amostras em simultâneo num curto espaço de tempo e com menos mão-de-obra.

3.8 Dinâmica do vírus na exploração

A dinâmica do vírus na produção intensiva de suínos não é conhecida pois apesar de ter sido alvo de vários estudos, os resultados obtidos não são concordantes. Conhecer a circulação do vírus na exploração assim como os factores que a promovem é relevante para seleccionar medidas preventivas para gerir focos de doença.

A principal via de transmissão do vírus é através da inalação e do contacto com secreções respiratórias de animais infectados. O vírus é excretado nas secreções nasais e disseminado por aerossóis. O contacto entre animais, situações de stress e factores determinantes de doença associados ao ambiente favorecem a disseminação do vírus entre explorações vizinhas (Brown, 2000).

Nakamura, Easterday, Pawlisch & Walker (1972) demonstraram que o vírus influenza circula todo o ano na exploração. Diversas hipóteses têm sido apresentadas quanto à manutenção do vírus na exploração. Alguns autores defendem que este se mantém a circular pela constante introdução de animais susceptíveis na exploração (Brown, 2000), outros Autores reportam a persistência do vírus em diversos órgãos dos suínos portadores (Mensik & Valicek, 1969). Segundo Van Reeth & Pensaert (1994) as elevadas seroprevalências devem-se a repetidas infecções pela constante introdução de animais infectados.

A divergência entre os resultados apresentados pode dever-se aos diferentes modelos experimentais utilizados nos estudos, uma vez que o ciclo viral é influenciado pelo sistema de produção (Deu, 2004), pelo tipo de exploração (Loeffen et al., 2009) e pelas medidas de biossegurança (Harris, 2000, Maes et al., 2000). Apesar destas divergências todos os estudos são concordantes no facto de que a fase mais afectada é a da engorda, uma vez que coincide com a diminuição dos AcM e há maior exposição dos animais ao vírus por contacto com animais infectados (Harris, 2000; Maes et al., 2000; Loeffen et al., 2009). A infecção pode ocorrer em momentos diferentes da fase de engorda consoante o sistema de produção. Na produção tradicional em ciclo fechado, a proximidade de grupos de animais de diversas idades resulta em elevadas taxas de transmissão e de infecção (Harris, 2000) no início da engorda. Os casos de doença nesta fase não muito evidentes porque os animais ainda estão parcialmente protegidos pelos AcM. Por outro lado, nas suiniculturas em que se faz apenas a recria e/ou acabamento, a exposição dos animais ao vírus ocorre mais tarde, quando já não existem AcM, resultando em surtos de doença (Loeffen et al., 2009).

Estudos serológicos demonstraram que 95% dos animais que entram nos matadouros europeus são seropositivos para um ou dois dos subtipos com maior prevalência (H1N1 e H3N2) (ESNIP2, 2006-2008).

3.9 Prevenção e controlo

O controlo da infecção por vírus influenza nas aves e nos suínos é de elevada importância, uma vez que impede a adaptação do vírus a novas espécies e a sua consequente disseminação, permitindo assim, reduzir o risco futuro de pandemias (Thacker & Janke, 2008).

Apesar do recurso a medidas de biossegurança ter a vantagem de poder eliminar vários agentes patogénicos da exploração (Loeffen, 2008), por si só, pode ser insuficiente para controlar a infecção (Van Reeth, 2007; Olsen et al., 2006). Deve-se, portanto, equacionar implementar um programa de vacinação.

3.9.1 Vacinação

As vacinas actualmente utilizadas na Europa são inactivadas, podendo conter o vírus inteiro ou apenas as proteínas HA e NA de dois subtipos do vírus influenza (H1N1 e H3N2). Estas vacinas estão disponíveis no mercado desde 1980 para administração intramuscular, com adjuvante oleoso e nenhuma delas contém o subtipo H1N2 (ESNIP2, 2006-2008) (Tabela 3). Estas vacinas estimulam a produção de elevados títulos de IgG contra a HA e parece existir alguma difusão dos Ac circulantes para os pulmões, o que garante a neutralização do vírus em caso de infecção (Loeffen et al., 2003a; Kitikoon et al., 2006). Consequentemente há relação directa entre o nível de Ac produzidos e o grau de protecção vacinal.

Tabela 3 – Vacinas disponíveis no mercado europeu (ESNIP, 2001-2003)

Nome (Empresa)	Estirpe vírus	Tipo	Dose de antigénio
Gripovac (Merial)	A/New Jersey/8/76 (H1N1)	Bivalente	H1N1 : $\geq 1,7$ HI unidades
	A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)		H3N2 : $\geq 2,2$ HI unidades
Suvaxyn Flu (Fort Dodge)	A/sw/Netherlands/25/80 (H1N1)	Vírus inteiro	H1N1 : 4 μ g HA
	A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)		H3N2 : 4 μ g HA
Gripork (Hipra)	A/sw/Ollost/84 (H1N1)	Vírus inteiro	H1N1 : 3×10^7 EID50
	A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)		H3N2 : $2,5 \times 10^7$ EID50
Respiporc Flu (IDT)	A/sw/Belgium/230/92 (H1N1)	Vírus inteiro	H1N1 : ≥ 256 HA unidades
	A/sw/Belgium/220/92 (H3N2)		H3N2 : ≥ 256 HA unidades

A protecção contra a infecção não é completa, mas, em contrapartida, a multiplicação e a excreção viral estão diminuídas (Kitikoon et al., 2006; Thacker & Janke, 2008). Van Reeth demonstrou que os níveis de citocinas em animais vacinados estão reduzidos entre 10 e 100 vezes. Desta forma, os animais estão completamente protegidos contra a doença.

Heinen, Van Nieuwstadt, Boer-Luijze & Bianchi (2001) demonstraram que os animais infectados naturalmente apresentavam uma protecção completa em caso de infecção. Segundo estes Autores, os animais vacinados apresentavam menor concentração de IgA nas mucosas nasais do que os animais previamente infectados. Um estudo demonstrou que

animais imunizados com uma vacina intranasal inactivada produziam Ac (IgA, IgM e IgG) nas secreções nasais e no soro, de tal forma que os animais eram completamente resistentes a uma infecção posterior (Lim et al., 2001)

De todas as vacinas disponíveis para vírus respiratórios, as dirigidas ao vírus influenza são as mais eficazes.

Diferenças entre a estirpe vacinal e a estirpe circulante podem não resultar em elevados níveis de Ac mas esta contrariedade pode ser superada com recurso a um adjuvante potente e a elevadas doses de antígeno (ESNIP2, 2006-2008).

No entanto, é importante recordar que estes resultados provêm de estudos experimentais. “No campo” existem múltiplos factores que interferem com a eficácia vacinal, nomeadamente a presença de Ac maternos (Loeffen et al., 2003a). Por este motivo recomenda-se a vacinação das reprodutoras. Os leitões nascidos de mães vacinadas apresentam títulos muito elevados de Ac que persistem até às 12-14 semanas de vida e os protegem da doença nesta fase crítica da sua vida produtiva (Loeffen, 2008).

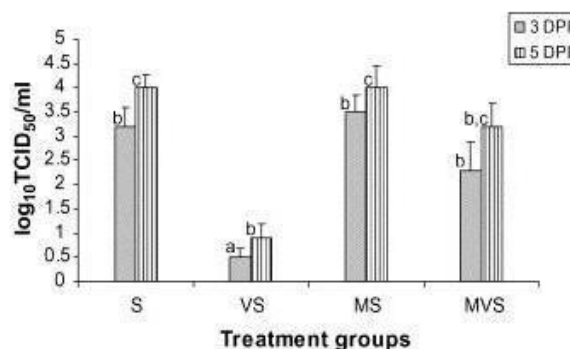
Ainda que a vacina não evite completamente a replicação viral, continua a ser custo-eficaz pois reduz o aparecimento e a severidade dos sinais clínicos. Desta forma mitigam-se as perdas económicas associadas à diminuição do índice de conversão (Deu, 2004; Heinen et al., 2001). Contudo, para maximizar a eficácia vacinal, é da maior importância respeitar o calendário vacinal. A primovacinação deve ser feita às 10 semanas de idade e consiste na administração de doses de vacina com 3-4 semanas de intervalo. Nas reprodutoras, efectuem-se revacinações semestrais e as primíparas e os varrascos adquiridos devem ser vacinados antes de entrar na exploração (Deu, 2004).

Embora não existam vacinas vivas disponíveis no mercado, a vantagem da sua utilização consistiria na maior estimulação da imunidade celular, dirigida principalmente contra a NA, o que daria protecção contra uma maior diversidade de subtipos. Contudo, a generalização da utilização de vacinas vivas poderia permitir a ocorrência de recombinações entre vírus circulantes e vírus vacinais que é a principal razão para não existir oferta deste tipo de vacinas (Thacker & Janke, 2008).

As vacinas de DNA estão também em estudo. Utilizam o gene que codifica a proteína viral de conformação normal, não correndo os riscos de utilização do vírus vivo. Estas vacinas produzem uma imunidade de longa duração através da estimulação das respostas humoral e celular (Thacker & Janke, 2008). A sua utilização seria de enorme interesse na fileira suíncola, uma vez que promoveria imunidade contra vários subtipos e a entrada do DNA na célula hospedeira iria minimizar a interferência dos Ac de origem materna (Thacker & Janke, 2008).

As vacinas de subunidades (com vectores) também estão a ser desenvolvidas (Thacker & Janke, 2008).

Figura 9 – Interferência dos Ac de origem materna na eficácia da vacinação (adaptado de Kitikoon et al., 2006)



Títulos virais em esfregaços nasais de animais não vacinados (S); MDA-, vacinados (VS); MDA+, não vacinados (MS) e MDA+, vacinados (MVS) após inoculação de H1N1 às 7 semanas de idade. Os resultados são apresentados em log₁₀TCID₅₀/ml ± S.E.M.. MDA, anticorpos de origem materna; DPI, dias após inoculação.

3.10 Impacto económico

A nível económico não existe informação quantitativa das perdas provocados pelo vírus influenza, mas as doenças respiratórias são responsáveis pelos maiores prejuízos económicos para a indústria suína (Van Reeth, Nauwynck & Pensaert, 1996; Loeffen et al., 1999; Gutiérrez-Martín et al., 2000). Os prejuízos provêm dos tratamentos, atrasos no crescimento, aumento do índice de conversão, diminuição da qualidade da carcaça (Van Reeth et al., 1996) e da mortalidade, que pode atingir 15% (Choi et al., 1988). Além destes, a infecção por vírus influenza quando complicada por agentes secundários pode ainda resultar na diminuição da performance reprodutiva, aborto, nascimento de leitões fracos e nados mortos (Olsen et al., 2006; Deu, 2004).

O maior impacto económico para o sector porcano ocorre quando o porco constitui uma potencial fonte de infecção para o Homem. O exemplo mais recente do impacto económico no sector animal relacionado com um surto epidémico no Homem ocorreu em 2003 quando o aparecimento de casos humanos de influenza aviária provocaram uma queda vertiginosa no consumo de frango e, sobretudo, uma paralisação das exportações do produto. O abate massivo das aves para consumo em regiões afectadas e a crise de confiança por parte do consumidor conduziram à falência de inúmeras empresas de produção de aves, cenário que ameaça actualmente a gigante norte-americana Pilgrim's Pride Corp (<http://www.reuters.com/article/bankruptcyNews/idUSN0742180120090507>).

No presente surto de gripe A/H1N1, a OMS já declarou não existir risco de infecção do Homem por consumo de carne de porco desde que cozinhada a 70°C e preparada de acordo com as boas práticas de higiene. Desta forma, não se justifica a implementação de medidas de restrição relativamente à importação de animais e seus derivados (Food and Agricultural Organization of the United States [FAO], 2009). Apesar deste comunicado o

Egipto já enviou para abate os 300.000 porcos existentes no país e a Rússia e a China embargaram a importação de suínos dos Estados Unidos. Apesar de não estar confirmada a circulação desta estirpe na população suína devem ser implementadas medidas de biossegurança e de vigilância epidemiológica. O impacto económico de uma eventual pandemia de gripe suína é, por enquanto, difícil de avaliar, no entanto se ficar demonstrada a infecção do porco por esta estirpe as medidas de restrição da circulação animal irão piorar o panorama económico (FAO, 2009).

3.11 Vigilância Epidemiológica

3.11.1 Europa

Com o objectivo de responder à escassez de informação sobre a frequência e a dispersão geográfica do vírus influenza foi criada em 2001 a primeira rede europeia de vigilância - *The European surveillance network for influenza in pigs* (ESNIP) que operou em duas fases. A ESNIP1, constituída por 14 participantes de 10 países europeus (2001-2003) e a ESNIP2, constituída por 9 participantes de 8 países europeus, um de Hong Kong e um dos Estados Unidos (2006-2008).

Os objectivos do programa foram estudar a epidemiologia e a evolução do vírus influenza suíno em diferentes países europeus e a caracterização genética e antigénica dos vírus circulantes; a standardização dos métodos de diagnóstico, através da actualização dos reagentes e do desenvolvimento de um kit ELISA; o estabelecimento de um banco de vírus e de uma base de dados; o estudo do risco que o vírus representa para a Saúde Pública, através da monitorização serológica dos suínos para as infecções por influenza aviar e a comparação dos vírus influenza que circulam actualmente em suínos, aves e humanos.

Os resultados dos ensaios serológicos realizados entre 2002 e 2003 na Alemanha, Bélgica, Espanha, Irlanda, Itália, Polónia e República Checa (gráfico 2) demonstraram que os três subtipos cocirculam em quase todos os países com excepção da Polónia.

O estudo da dinâmica do vírus na exploração, realizado entre 2006 e 2007, demonstrou que não existe um padrão sazonal de circulação do vírus. Apenas 4% das explorações eram positivas aos três subtipos, sendo a faixa etária mais afectada dos 3 aos 6 meses. Este estudo concluiu que não existe um padrão de infecção. Desta forma, uma exploração seropositiva para um determinado subtipo num determinado período de tempo pode ser seronegativa 6 meses depois (ESNIP2, 2006-2008).

Gráfico 2 – Proporção seropositivos por faixa etária (ESNIP2, 2006-2008)

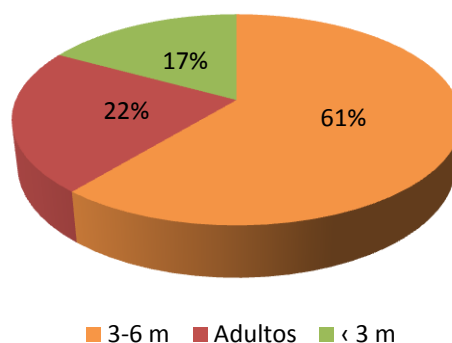
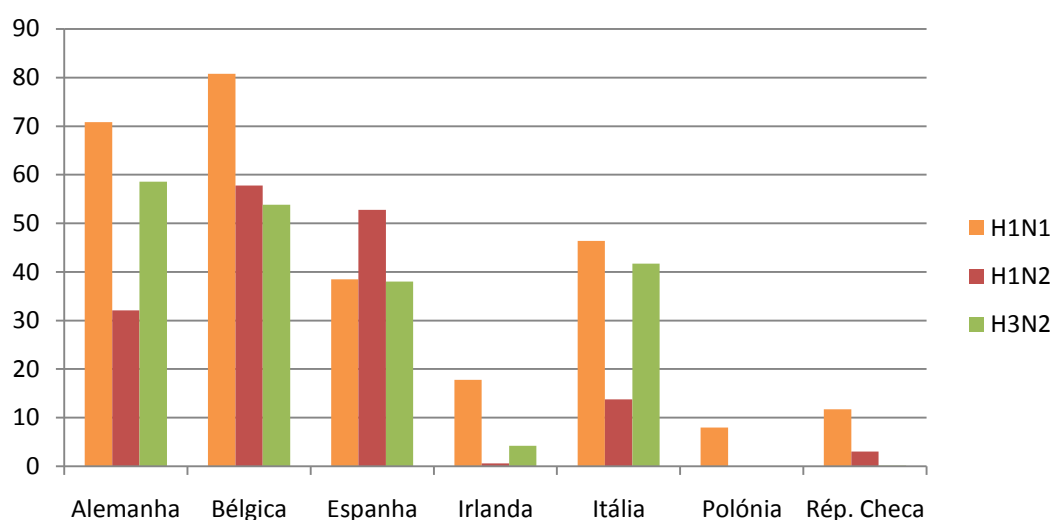


Gráfico 3 - Proporção de reprodutoras seropositivas em 7 países da Europa em 2002-2003 (adaptado de ESNIP1, 2001-2003)



3.11.2 Ásia

A ocorrência de duas pandemias (Asiática em 1957 e a de Hong Kong em 1968); a constante emergência de estirpes e de subtipos; e os surtos de H5N1 (1997 e 2003) e H9N2 (1999) no Homem fazem com que este continente seja considerado o "epicentro" do vírus influenza (Peiris et al., 2001; Cong et al., 2007).

A elevada ocorrência de mutações e de recombinações é facilitada pelas elevadas densidades populacionais. Os tradicionais mercados de aves vivas favorecem o contacto entre o Homem, o porco e as aves aumentando a exposição e a transmissão entre espécies. Apesar do vírus influenza circular actualmente na Coreia, China, Japão, República da China e Tailândia, a epidemiologia do vírus é diferente entre países (ESNIP1, 2001-2003). O grande motivo de preocupação é a cocirculação dos subtipos H9N2 de origem aviar, H3N2 de origem humana, H5N1 de origem aviar e H1N1 clássico. Todos estes subtipos têm sido isolados na população suína, alertando para a emergência de novos vírus capazes de,

eventualmente, provocar pandemias na população humana (Peiris et al., 2001; Choi, et al., 2004a; Cong et al., 2007).

3.11.3 Estados Unidos da América

Em 2006, o subtipo H2N3, resultante de uma recombinação entre uma estirpe aviar e suína foi isolado em duas explorações de suínos com história de doença respiratória. Este subtipo apenas circula em aves (principalmente migratórias) e nunca tinha sido isolado em suínos. O facto de pertencer ao subtipo responsável pela pandemia Asiática de 1957 torna-o um risco para a Saúde Pública (Gramer, 2007; Ma et al., 2007)

4. Materiais e métodos

4.1 Amostragem

De acordo com os dados fornecidos pelo *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino* (2007) o número de suínos em Espanha é de 28.387.242, divididos por 71.067 explorações registadas e no activo.

O tamanho da amostra foi calculado no programa Win Episcopo 2.0 assumindo uma prevalência esperada de 50%, uma precisão de 10% e um nível de confiança de 95%, resultando numa amostragem de 97 explorações. No entanto, os dados analisados na presente dissertação reportam apenas a 4 explorações de reprodutoras localizadas na Comunidade Autónoma da Catalunha. Motivos da autoria, confidencialidade e divisão interna de trabalho/outputs condicionaram esta disponibilidade de dados.

De cada exploração foram colhidas amostras de sangue de 14 reprodutoras de diversas idades e de 10 animais com 3, 7, 11, 15 e 20 semanas de vida. As explorações foram seleccionadas aleatoriamente pelo método de amostragem aleatória estratificada proporcional. O estrato considerado foi a Comunidade Autónoma da Catalunha. Os animais foram seleccionados por conveniência.

A colheita de amostras foi acompanhada da realização dum inquérito epidemiológico relativo às características gerais da exploração, ao historial de infecções por vírus influenza e a diversos aspectos de biossegurança com base numa entrevista presencial ao proprietário da suinicultura.

Os dados recolhidos nos inquéritos foram posteriormente introduzidos numa base de dados construída em Excel 2007 para análise estatística.

4.2 Selecção das unidades amostrais (explorações)

Para a selecção das explorações foram consideradas unicamente as Comunidades Autónomas em que o censo porcino fosse superior a 2%. As 4 explorações deste estudo localizam-se na Comunidade Autónoma da Catalunha que representa 25,7% do censo porcino de Espanha. Todas as explorações são de reprodutoras e foram seleccionadas apenas as que não procediam à vacinação para o vírus influenza.

4.3 Inquérito Epidemiológico

O inquérito teve como objectivo recolher informação estruturada sobre as características gerais da exploração, factores de produção, instalações, estatuto sanitário da exploração e medidas de biossegurança (ver Anexo 1). Os inquéritos foram realizados aos produtores por um membro da equipa durante a visita à exploração (figura 10). A informação referente às 4 explorações deste estudo está reunida na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização das 4 explorações de suínos investigadas

		Exploração 1	Exploração 2	Exploração 3	Exploração 4
	Integradora	Não	Não	Sim	Sim
	Tipo de produção	?	Multisite ¹	Multisite	Fechado
	All in/All out	M + T + E	M + T + E	M + T + Q	M + T + E + Q
Censo actual	Reprodutoras	110	510	760	1247
	Varrascos	1	4	6	11
	Transição (>4 semanas)	350	1500	1400	2470
	Engorda/Acabamento	560	3800	3500	4320
	Distância à exploração mais próxima (m)	1000	1000	1000	1100
Reposição	Origem das primíparas	Externa	Externa	Própria	Externa
Quarentena	Realiza?	Não	Não	Sim	Sim
Controlo de pragas	Redes nas janelas	Não	Não	Sim	Não
Estatuto sanitário	PRRS	Seropositivo	Seronegativo	Seropositivo	Seronegativo
	Aujeszky	Seronegativo	Seronegativo	Seropositivo	Seronegativo
Problemas respiratórios	Prob. resp. último ano	Sim	Não	Sim	Não
	Fase prob. Resp.	Engorda	_____	Transição	_____

M=Maternidade; T=Transição; E=Engorda

Figura 10 – Realização do inquérito epidemiológico ao produtor



4.4 Materiais para recolha de amostras biológicas

Todo o material necessário para a colheita de amostras foi utilizado numa única exploração. Desta forma evitou-se a potencial entrada de material contaminado em explorações indemnes.

¹ Multisite ou sistema de produção em múltiplas fases incluem todas as suiniculturas em que os animais estão separados fisicamente por grupos de idades ou por fases de produção.

Lista de material utilizado em cada exploração:

- Fatos-macacos
- Botas
- Luvas
- Canetas
- Etiquetas
- fita adesiva
- marcadores
- tubos de vácuo (*vacutainer*) de 10ml
- adaptador para tubo de vácuo
- agulhas (0,9Gx25mm e 1,2Gx38mm)
- bisturis
- contentor para resíduos
- laço para contenção
- suportes para tubos
- sacos para lixo
- caixas para transporte de amostras biológicas
- acumuladores de gelo
- frigorífico
- lixívia
- inquérito epidemiológico.

A mestranda foi responsável por toda a logística relativa ao material e equipamento necessários à recolha de amostras biológicas e dados nas suiniculturas visitadas.

4.5 Colheita de amostras biológicas

O local de recolha de sangue variou consoante a idade e com a facilidade de contenção. Nas reprodutoras, a colheita foi efectuada a partir da veia coccígea e nos restantes animais a partir da veia cava cranial ou jugular. De cada suíno, foram extraídos 10 ml de sangue com o auxílio de um *vacutainer* para recolha de soro.

Usou-se sempre material descartável para impedir contaminações cruzadas.

Os tubos, devidamente etiquetados com a idade do animal e o número da exploração, foram armazenados em caixas isotérmicas para transporte de material biológico e protegidos com esferovite e acumuladores de gelo. O transporte para o laboratório, realizado por uma empresa especializada, de 48 em 48 horas, assegurando sempre que a temperatura das amostras biológicas não excedia os 4°C.

Figura 11 – Colheita de sangue pela veia jugular em leitões de 3 semanas



A mestranda participou nas rotinas de colheita de sangue para diagnóstico laboratorial da gripe suína e foi responsável por toda a logística de identificação/etiquetagem dos tubos para recolha de sangue, e do seu acondicionamento em caixas isotérmicas a $\approx 4^{\circ}\text{C}$, nas 19 suiniculturas visitadas.

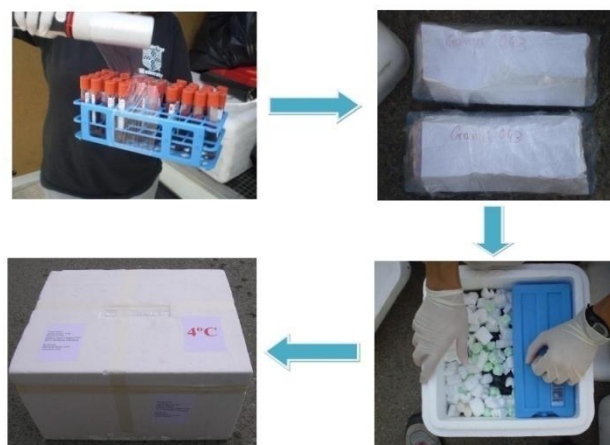
Figura 12 – Colheita de sangue na veia jugular em suínos de 15 semanas



Figura 13 – Colheita de sangue na veia coccígea em reprodutoras



Figura 14 – Identificação e acondicionamento das amostras de sangue em caixa isotérmica



4.6 Processamento das amostras biológicas

Até 48 horas após a recolha, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a 2.700 rpm a uma temperatura constante de 4°C. O soro extraído foi distribuído por duas alíquotas de 1 ml e por tubos de seroteca previamente etiquetados. Cada alíquota foi colocada numa caixa distinta consoante o teste laboratorial a realizar: ELISA ou IH.

4.7 Diagnóstico laboratorial

As amostras foram armazenadas a - 80°C até à realização das análises.

O diagnóstico foi realizado no Laboratório de Virologia do CreSA.

As amostras de soro foram analisadas, inicialmente, por um teste ELISA (CIVTEST™ SUI INFLUENZA, Laboratórios HIPRA S.A., Amer, Espanha) de especificidade 100% e sensibilidade 100%, 73,4% e 86,9% para H1N1, H1N2 e H3N2, respectivamente. Este ELISA é dirigido as principais hemaglutininas que circulam actualmente na população suína espanhola (H1 e H3). Posteriormente as amostras positivas no ELISA foram submetidas ao teste de IH (OIE, 2004).

4.8 Cultura celular e multiplicação viral

As culturas celulares foram realizadas para a multiplicação do vírus comercial utilizado na IH.

Apesar do vírus influenza replicar em várias linhas celulares como as células VERO (Olsen et al., 2006), células epiteliais do rim, do testículo ou do pulmão de suínos (OIE, 2004), as MDCK (Madin-Darby canine kidney) são as mais utilizadas e as que usámos.

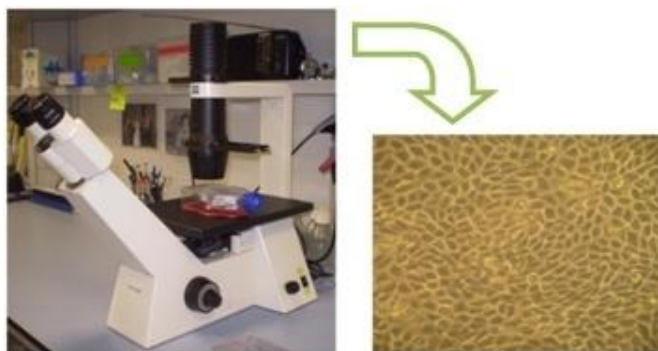
Para a cultura, as células MDCK foram mantidas em meio comercial MEM (Minimal Essential Medium MEM, GIBCO ref. nº 21090) suplementado com 10% de soro fetal de bovino, bicarbonato de sódio, piruvato, glutamina, penicilina-estreptomicina e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

As culturas foram realizadas em triplicado para multiplicação de cada um dos subtipos necessários à execução da IH. Foram realizados entre vinte a trinta passes celulares até se proceder à infecção das células. O momento da infecção coincidiu com a formação completa da monocamada celular.

Os subtipos virais (pertencentes às estirpes de ref. nº SW-HAG-INFH1N1, SW-HAG-INFH1N2, SW-HAG-INFH3N2, www.gddeventer.com) foram utilizados num volume de 100µl (diluídos em água MiliQ autoclavada), adicionados a 395,5µl de meio MEM suplementado com 2,5 µl de tripsina. Depois de colocados nas respectivas garrafas de cultura, foram incubados durante 90 minutos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Decorrido este tempo foi adicionado meio de cultura MEM e as garrafas recolocadas na estufa.

As células foram examinadas diariamente durante sete dias consecutivos até se observar efeito citopático em pelo menos 50% da monocamada celular. Após centrifugação, o sobrenadante que continha o vírus foi colocado em alíquotas de 1 ml e armazenado a - 80°C até à sua utilização, pois o vírus influenza não é estável a - 20°.

Figura 15 – Cultura de células MDCK



A mestranda acompanhou e colaborou em todas as etapas referidas.

4.9 ELISA

As amostras foram processadas num Kit ELISA (CIVTEST™ SUI INFLUENZA, Laboratórios HIPRA S.A., Amer, Espanha) cujas especificação e valores intrínsecos estão referidos em 4.7.

Este teste foi realizado por outra equipa integrada do projecto.

4.10 Inibição da Hemaglutinação

Os testes de IH para os 3 subtipos virais circulantes, actualmente, na população suína em Espanha – H1N1, H1N2 e H3N2 – foram realizados seguindo o protocolo da OIE (2004).

Devido ao potencial zoonótico do vírus, todas as manipulações de amostras biológicas foram realizadas numa câmara de fluxo laminar.

A mestranda foi treinada na execução da IH.

4.10.1 Processamento do soro sanguíneo

O soro pode apresentar aglutininas e receptores inespecíficos. Para que estes não interferissem com os resultados do teste, o soro foi submetido ao seguinte processamento:

- (i) destruição dos receptores inespecíficos através da adição de 200 µl de receptor-destroying enzyme (RDE). Após incubação de 18 horas a 37°C, foram adicionados 150 µl de citrato de sódio a 2,5%, seguido da inativação térmica a 56°C durante 30 minutos;
- (ii) para remoção das aglutininas, o soro foi processado com eritrócitos de galinha a 50%, incubado 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugado durante 10 minutos, após o qual o sobrenadante foi recolhido.

4.10.2 Estandardização do vírus

Para facilitar a leitura das placas e a interpretação comparativa dos resultados, os vírus devem apresentar 8 unidades hemaglutinantes (UH) em 50 µl (ou 4 UH/25 µl). Por isso, cada subtipo do vírus utilizado foi titulado na prova de Hemaglutinação (HA) e posteriormente diluído em phosphate-buffered saline (PBS) a 0,01 M e a pH7.

4.10.3 Diluições

O teste de IH foi realizado em triplicado pelo método de microtitulação em placas de 96 pocilhos, fundo em U, com volumes de 50 µl. O antígeno comercial utilizado foi previamente titulado de modo a garantir-se a utilização de 8 unidades de antígeno. Os soros foram testados em diluições seriadas, a partir da diluição inicial de 1:20.

A leitura das placas foi efectuada 30 minutos após a incubação. O título de IH foi considerado a maior diluição de soro capaz de inibir pelo menos 50% da aglutinação de 8 UH do vírus.

Foram considerados positivos e específicos os títulos \geq a 1:20.

4.11 Análise estatística

Os dados da IH analisados na dissertação são referentes apenas às reprodutoras e aos leitões de 20 semanas. Os resultados dos ensaios laboratoriais e dos questionários das 4 explorações investigadas foram cedidos pelo CReSA.

Os dados foram introduzidos, armazenados e validados numa base de dados e, posteriormente analisados na folha-de-cálculo Excel 2007 e na aplicação Statcalc do programa Epi Info, versão 6.0. Foi realizada uma análise exploratória descritiva das 4 explorações. Para este efeito foi calculada a (i) prevalência dos três subtipos, (ii) a prevalência de suínos positivos a pelo menos dois subtipos e aos três subtipos, (iii) a diferença de prevalências entre grupos etários nos três subtipos, (iv) as prevalências por

exploração e (v) as prevalências nos vários sistemas de produção (ciclo fechado e ciclo aberto).

Os intervalos de confiança de 95% foram calculados com base na seguinte fórmula (Houe, Ersbøll & Toft, 2004):

$$IC: P \pm Z_{1-\alpha/2} \frac{\sqrt{P(1-P)}}{n}$$

Onde, P – prevalência

Z – valor da distribuição normal (Z=1,96)

n – tamanho da amostra

5. Resultados

Nesta análise, o valor de cut-off adoptado para o teste de IH foi de 1:20. Foram realizadas 258 análises, 144 pertenciam a reprodutoras (55,8%) e 114 a leitões de 20 semanas de idade (44,2%). Dos 252 resultados válidos, 161 foram positivos (62,9%) e 91 foram negativos (37,1%).

As reprodutoras apresentaram maior número de animais positivos (99) em comparação com os leitões de 20 semanas (62). Esta diferença é estatisticamente significativa: $\chi^2=7,20$ (Mantel-Haenszel) e $p=0,007$. A probabilidade de detecção de títulos $\geq 1:20$ de vírus influenza é cerca de 2 vezes mais nas reprodutoras que nos leitões (OR=2,04; $1,17 < OR < 3,55$).

Tabela 5 – Resultados do teste de IH para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 em reprodutoras

Reprodutoras									
	H1N1			H1N2			H3N2		
	pos	neg	nulo	pos	neg	nulo	pos	neg	nulo
Explo1	13	0	0	0	13	0	13	0	0
Explo2	5	4	2	0	10	1	10	0	1
Explo3	11	0	0	2	9	0	11	0	0
Explo4	13	0	0	9	4	0	12	0	1
n	42	4	2	11	36	1	46	0	2

O subtipo H3N2 apresentou maior número de animais positivos tanto em reprodutoras (46) como em leitões de 20 semanas (33), seguindo-se o subtipo H1N1 com 42 e 28 animais positivos em reprodutoras e leitões de 20 semanas, respectivamente. Esta diferença é estatisticamente significativa: $\chi^2=52,32$; $p=0,000$. A probabilidade de ocorrência de suínos seropositivos ao H3N2 é 21 vezes superior à ocorrência dos outros dois subtipos juntos (OR=20,95; $7,29 < OR < 81,52$).

Apenas 11 reprodutoras e 1 leitão testaram positivos ao subtipo H1N2 (tabelas 5 e 6).

Tabela 6 – Resultados do teste de IH para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 em leitões de 20 semanas de idade

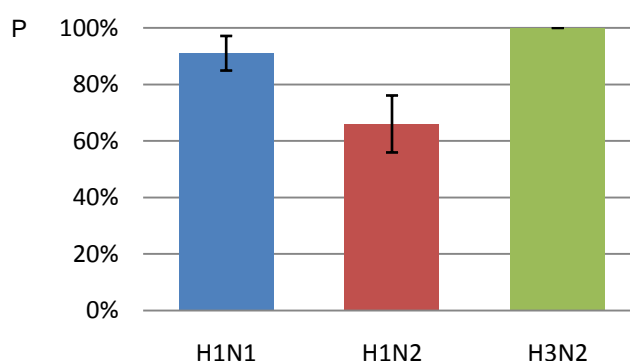
20 semanas									
	H1N1			H1N2			H3N2		
	pos	neg	nulo	pos	neg	nulo	pos	neg	nulo
Explo1	10	0	0	0	10	0	10	0	0
Explo2	2	7	0	0	9	0	6	3	0
Explo3	7	3	0	0	10	0	10	0	0
Explo4	9	0	0	1	8	0	7	1	1
n	28	10	0	1	37	0	33	4	1

Tabela 7 – Prevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas quatro explorações, em reprodutoras e leitões de 20 semanas, nas explorações 1, 2, 3 e 4, nas explorações com sistema de produção em ciclo fechado (2 e 3) e nas explorações com sistema de produção em múltiplas fases (4)

	H1N1	IC95%	H1N2	IC95%	H3N2	IC95%
	0,91	IC95%[0,899;0,971]	0,66	IC95%[0,559;0,761]	1,00	IC95%[1;1]
Repro	0,91	IC95%[0,832;0,994]	0,23	IC95%[0,113;0,355]	1,00	IC95%[1;1]
20 sem	0,74	IC95%[0,597;0,877]	0,03	IC95%[0,000;0,077]	0,89	IC95%[0,792;0,992]
Explo1	1,00	IC95%[1;1]	0,00	IC95%[0;0]	1,00	IC95%[1;1]
Explo2	0,39	IC95%[0,164;0,614]	0,00	IC95%[0;0]	0,84	IC95%[0,678;1]
Explo3	0,86	IC95%[0,707;1]	0,10	IC95%[0,000;0,221]	1,00	IC95%[1;1]
Explo4	1,00	IC95%[1;1]	0,45	IC95%[0,246;0,663]	0,95	IC95%[0,854;1]
Ciclo aberto (2, 3)	0,64	IC95%[0,490;0,792]	0,05	IC95%[0,000;0,118]	0,93	IC95%[0,843;1]
Ciclo fechado (4)	1,00	IC95%[1;1]	0,45	IC95%[0,246;0,663]	0,95	IC95%[0,854;1]

O subtipo H3N2 predominou na população em estudo com uma seroprevalência de 100%, seguindo-se o subtipo H1N1 (91%) e o subtipo H1N2 (66%) (tabela 7, gráfico 4).

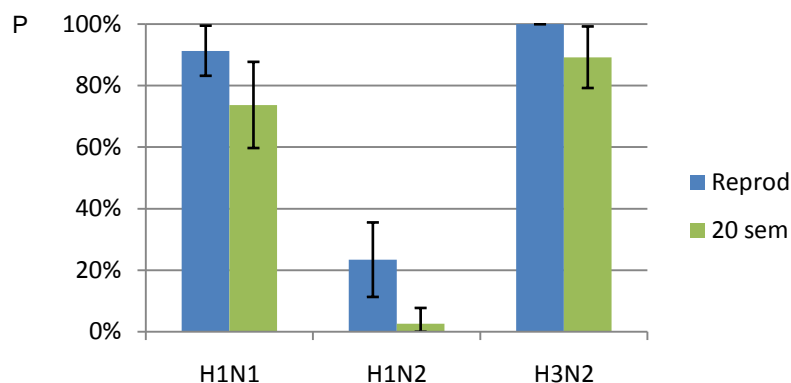
Gráfico 4 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2



Tanto as reprodutoras como os leitões de 20 semanas foram seropositivos para os três subtipos. No entanto, as reprodutoras apresentaram seroprevalências mais elevadas (91%, 23% e 100% para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2, respectivamente) em comparação com

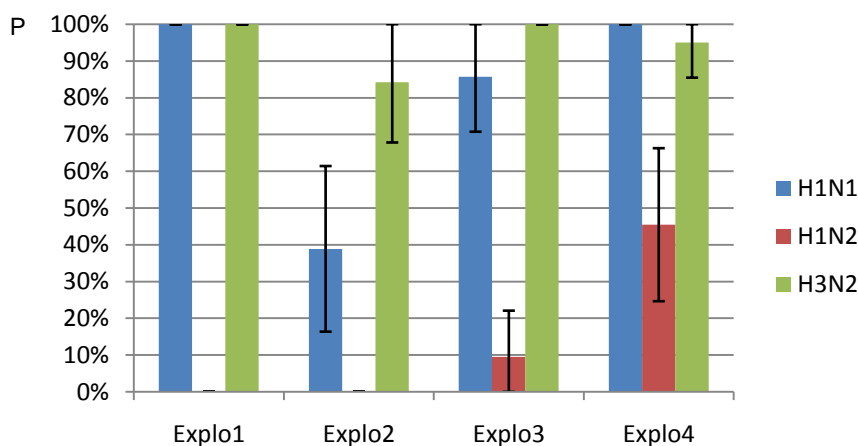
os leitões de 20 semanas (74%, 3% e 89% para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2, respectivamente) (tabela 7, gráfico 5).

Gráfico 5 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 em reprodutoras e em leitões de 20 semanas



Os subtipos H1N1 e H3N2 estavam presentes nas quatro explorações, enquanto o subtipo H1N2 apenas circulava nas explorações 3 e 4. O subtipo H3N2 apresentou seroprevalências mais elevadas (100%, 84%, 100% e 95% nas explorações 1, 2, 3 e 4 respectivamente) comparativamente com os subtipos H1N1 (100%, 39%, 86% e 100%) e H1N2 (10% e 45%) (tabela 7, gráfico 6).

Gráfico 6 - Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas suiniculturas 1, 2, 3 e 4



Foi notória a diferença de seroprevalências entre os sistemas de produção. O sistema de produção em ciclo fechado apresentou seroprevalências mais elevadas para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 comparativamente com o sistema de produção em múltiplas fases. A alteração mais evidente foi o aumento de prevalência de 5% para 45% do subtipo H1N2 (tabela 7, gráfico 7).

Gráfico 7 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas explorações 2 e 3 (sistema de produção em múltiplas fases) e na exploração 4 (sistema de produção em ciclo fechado)

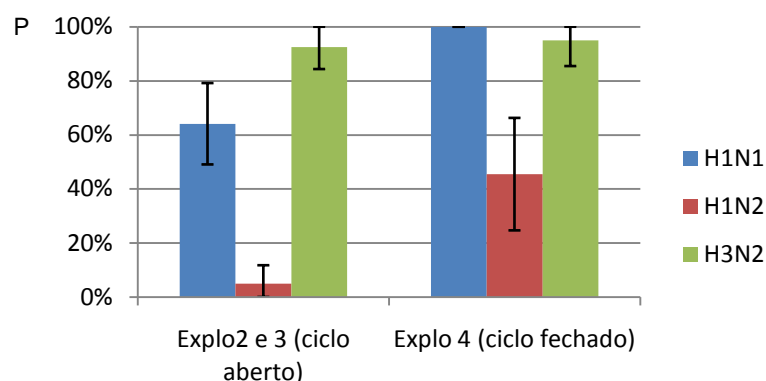


Tabela 8 - Prevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 para reprodutoras e leitões de 20 semanas em sistema de produção fechado

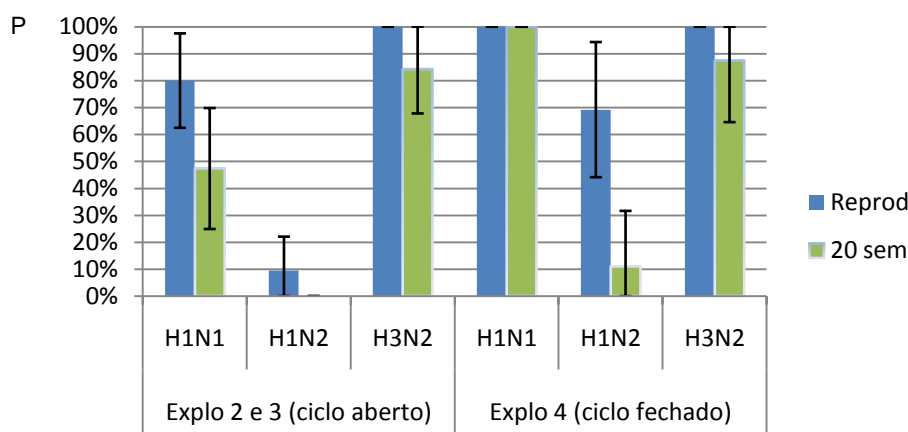
Exploração 4 (ciclo fechado)						
	H1N1	IC	H1N2	IC	H3N2	IC
Reprod	1	IC95%[1;1]	0,69	IC95%[0,441;0,943]	1,00	IC95%[1;1]
20 sem	1	IC95%[1;1]	0,11	IC95%[0;0,316]	0,88	IC95%[0,646;1]

Tabela 9 – Prevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 para reprodutoras e leitões de 20 semanas em sistema de produção em múltiplas fases

Explorações 2 e 3 (múltiplas fases)						
	H1N1	IC	H1N2	IC	H3N2	IC
Reprod	0,80	IC95%[0,625;0,975]	0,10	IC95%[0;0,221]	1,00	IC95%[1;1]
20 sem	0,47	IC95%[0,249;0,698]	0,00	IC95%[0;0]	0,84	IC95%[0,678;1]

As reprodutoras provenientes de explorações com sistema de produção em ciclo fechado apresentaram seroprevalências mais elevadas para os subtipos H1N1 (100%) e H1N2 (69%) em comparação com as reprodutoras provenientes de explorações com sistemas de produção em múltiplas fases, com exceção do subtipo H3N2 que apresentou 100% de seroprevalência em ambos os sistemas de produção (tabelas 8 e 9, gráfico 8).

Gráfico 8 – Seroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 nas explorações 2 e 3 (sistema de produção em múltiplas fases) e na exploração 4 (sistema de produção em ciclo fechado) em reprodutoras e em leitões de 20 semanas



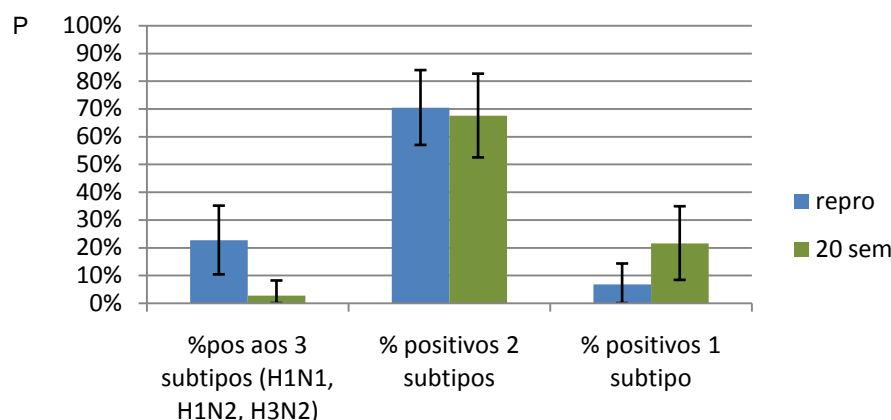
Da mesma forma, as seroprevalências para os leitões de 20 semanas foram superiores em sistema de produção em ciclo fechado (100%, 11% e 88% para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2, respectivamente) comparativamente aos sistemas de produção em múltiplas fases (47%, 0% e 84% para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2, respectivamente) (tabelas 8 e 9, gráfico 8).

Tabela 10 – Proporção de animais positivos aos 3 subtipos, a 2 subtipos e a 1 subtipo para reprodutoras e leitões de 20 semanas de idade

	Repro	IC95% Repro	20 sem	IC95% 20 sem
% positivos 3 subtipos	0,23	IC95%[0,103;0,351]	0,03	IC95%[0;0,081]
% positivos 2 subtipos	0,70	IC95%[0,57;0,839]	0,68	IC95%[0,525;0,827]
% positivos 1 subtipo	0,07	IC95%[0;0,143]	0,22	IC95%[0,084;0,349]

A maior parte das reprodutoras foram seropositivas a 2 (70%) ou a 3 (23%) subtipos em simultâneo. A maior parte dos leitões de 20 semanas foram seropositivos para 1 (22%) subtipo ou para a combinação de 2 (68%) subtipos. Apenas uma reduzida proporção foi positiva para a combinação dos 3 (3%) subtipos (tabela 10, gráfico 9).

Gráfico 9 – Proporção de suínos positivos a 3 subtipos, 2 subtipos e a 1 subtipo



6. Discussão

Desde a década de 90 que os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 cocirculam na população de suínos europeia. As investigações serológicas realizadas no âmbito do programa de vigilância da ESNIP1 e 2 (2001-2003; 2006-2008) revelaram alterações na epidemiologia do vírus influenza nos últimos oito anos.

O recente aparecimento do subtipo H1N2 e a sua disseminação forçaram a alterar as rotinas de diagnóstico e os métodos de controlo que vigoravam.

Em Espanha, a seroprevalência dos três subtipos tem exibido oscilações do tempo. Em 2002-2003, o subtipo H1N2 predominava nas reprodutoras (52,8%) (ESNIP1, 2001-2003). Em 2007, Maldonado demonstrou que em Espanha predominava o subtipo H3N2 (58,7%). No entanto, os resultados da serovigilância realizada pela ESNIP em 2006-2007 demonstraram que o subtipo H1N2 predominava nas explorações amostradas.

Apesar das suiniculturas analisadas por nós (n=4) serem uma fracção muito pequena da amostra calculada para assegurar representatividade do projecto CReSA (n=97), os resultados obtidos são concordantes com os reportados por Maldonado (2007). O subtipo H3N2 atingiu uma seroprevalência de 100% (tabela 7 e gráfico 4). A prevalência dos subtipos parece estar relacionada com a prevalência regional (ESNIP2, 2006-2008).

A diferença detectada entre as seroprevalências das reprodutoras e dos leitões de 20 semanas (tabelas 7, 8 e 9; gráficos 5 e 8) tem sido alvo de vários estudos. Loeffen *et al.* (2003b) demonstraram que os leitões se encontram protegidos da infecção pelos AcM até às 8-9 semanas de vida, desta forma a infecção tende a não ocorrer até esta idade. Este factor pode explicar a prevalência mais baixa em leitões de 20 semanas. Por outro lado, o sistema de produção, as características da suinicultura e as medidas de biossegurança em vigor, parecem condicionar a dinâmica da infecção. De facto, as seroprevalências para os três subtipos variam nas quatro explorações. O factor mais evidente é a ausência do subtipo H1N2 nas explorações 1 e 2 (tabela 7 e gráfico 6). A falta de informação sobre a circulação do subtipo H1N2 na população suína em Espanha conduziu à realização de um estudo

epidemiológico que quantificou o envolvimento deste subtipo nos casos de Doença Respiratória Aguda e a sua cocirculação com os subtipos H1N1 e H3N2 estabelecidos desde a década de 80 (Maldonado *et al.*, 2006). A escala da nossa análise não nos permite explicar a presença deste subtipo apenas nas explorações 3 e 4.

Ambos os grupos etários apresentaram seroprevalências mais elevadas na exploração 4, que labora em ciclo fechado, comparativamente às explorações 2 e 3, sistemas de produção em múltiplas fases (tabelas 8 e 9; gráficos 7 e 8). As diferenças na prevalência da infecção entre sistemas de produção foram referidos por Loeffen *et al.* (2009) e podem estar relacionadas com a presença de animais na fase de engorda. As reprodutoras, e principalmente os leitões na fase de desmame (3 semanas), podem actuar como reservatórios do vírus assegurando a contínua circulação do vírus e a exposição dos suínos na fase de engorda. A maior exposição ao vírus nas explorações de ciclo fechado resulta numa maior incidência em comparação com as explorações em múltiplas fases (Loeffen *et al.*, 2009).

Além disso, na produção tradicional em ciclo fechado, a proximidade de grupos de animais de diversas idades resulta em elevadas taxas de transmissão e de infecção (Harris, 2000). A seroprevalência mais elevada do subtipo H1N2 na exploração 4 (45%) em relação às explorações 2 e 3 (5%) pode estar relacionada com este factor.

Deu (2004) afirmou que neste sistema de produção o vírus pode se estabelecer de forma crónica com aparecimento de problemas reprodutivos em animais seronegativos e sintomas respiratórios em alguns animais de cada lote. A produção em ciclo fechado tem sido gradualmente substituída por produção em múltiplas fases. Este tipo de produção permite quebrar o ciclo do vírus e diminuir a frequência de infecção dos leitões a partir do fim da imunidade materna (3 semanas) através da separação física dos animais de cada uma das 3 fases de produção (maternidade, transição e engorda) e da implementação de práticas de *all in/all out* associadas à execução rigorosa de operações de lavagem, desinfecção e vazio sanitário das instalações.

A maior parte das reprodutoras foram seropositivas a 2 (70%) ou a 3 (23%) subtipos em simultâneo. A maioria dos leitões de 20 semanas foram seropositivos para 1 (22%) subtipo ou para a combinação de 2 (68%) subtipos. Só 3% foram positivos para a combinação dos 3 subtipos (tabela 10 e gráfico 9).

Este facto pode ser explicado pela longevidade da vida útil produtiva das reprodutoras e a sua consequente maior exposição aos 3 subtipos (Van Reeth, Labarque & Pensaert, 2004b). Medidas de biossegurança como práticas de higiene, ventilação e densidade adequada de suínos por parque e/ou município têm sido investigadas em diversos estudos e demonstrou-se que podem ter um impacto considerável no ciclo viral na exploração. Por exemplo, as quatro explorações têm implementadas práticas de *all in/all out* mas as explorações 1 e 2

efectuam a reposição do efectivo com animais provenientes de outras suiniculturas e sem recurso a práticas de quarentena ou de vacinação.

Apesar do contínuo melhoramento na qualidade de execução das medidas de biossegurança, a maior parte das explorações não está completamente protegida de perigos biológicos exteriores. Por exemplo, a possibilidade de entrada de vírus via aves sinantrópicas ou migratórias não pode ser descartada (figura 15). De acordo com um estudo realizado por Casal, De Manuel, Mateu & Martín (2007) 29% das explorações de reprodutoras não dispõem de protecção para a entrada de aves nos pavilhões. De notar que das quatro explorações investigadas apenas a exploração 3 apresentava redes nas janelas. A infecção simultânea de várias explorações numa mesma área, como referido anteriormente, pode ser devida à dispersão aérea do vírus pelo vento e não necessariamente à introdução de animais infectados (Brown, 2000; Maes *et al.*, 2000). A elevada densidade de animais por município e por exploração contribuiu para elevadas seroprevalências de vírus influenza.

Figura 16 – Contacto entre suínos e aves



7. Conclusão

O vírus influenza está disperso por todo o mundo e são visíveis as constantes alterações genéticas e antigénicas. A ameaça que representam para a Saúde Pública é evidente.

A vigilância epidemiológica é a ferramenta mais rápida e com melhor custo-eficácia para detectar precocemente novos focos de doença e para monitorizar a sua frequência e distribuição espaço-temporal, de modo a prevenir a ocorrência de pandemias.

A vigilância da emergência de novos subtipos no suíno deve integrar a vigilância dos vírus aviários e humanos, principalmente nas áreas de maior risco, onde as elevadas densidades animais favorecem o contacto entre espécies susceptíveis.

É importante desenhar, testar e implementar uma rede de vigilância epidemiológica da gripe suína em Portugal. As pandemias de H5N1 e de gripe mexicana (H1N1), ainda em evolução, são exemplos de cenários epidemiológicos mas também sócio-económicos e políticos que requerem este tipo de informação para tomadas de decisão de Saúde Humana e Animal.

Seria também oportuno a realização de um estudo epidemiológico transversal, à escala nacional, numa amostra representativa da população, que fornecesse dados de base quanto à sua frequência, distribuição espaço-temporal, vírus em circulação, etc., à semelhança do estudo em que colaborámos nas Comunidades Autónomas de Espanha ou que foi realizado recentemente em Portugal para a salmonelose nos suínos e nas aves.

Bibliografía

- Bai, G.R., Sakoda, Y., Mweene, A.S., Kishida, N., Yamada, T., Minakawa, H. & Kida, H., (2005), Evaluation of the ESPLINE INFLUENZA A&B-N Kit for the diagnosis of avian and swine influenza, *Microbiology and immunology*, vol:49(12), pp:1063-7
- Blaskovic, D., Rathova, V., Skoda, R., Kociskova, D. & Kaplan, M.M., 1970. Experimental infection of weanling pigs with A/Influenza virus. *Bulletin of the World Health Organization*, vol:42, pp:757-765
- Brown, I.H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary microbiology*, vol:74, pp:29-46.
- Brown, I.H. (2002), Los virus A de la Influenza en los cerdos de Europa. In Morilla, A., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (eds.) *Enfermedades víricas emergentes del cerdo*, pp: 37-46, Iowa: Blackwell Publishing
- Carrasco, L. & Río, J.M.A. (2006). *Virus Patógenos. Orthomyxoviridae*. pp:377-392. Madrid: Editorial Hélice
- Casal, J., De Manuel, A., Mateu, E. & Martín, M., (2007), Biosecurity measures on swine farms in Spain: perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures, *Preventive veterinary medicine*, vol: 15;82(1-2), pp: 138-50
- Centers for Disease Control and Prevention (2009), disponible em: www.cdc.gov
- Choi, Y.K., Sagar, M. & Joo, H.S., (1988), Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs, *The Canadian veterinary journal*, vol: 44(9), pp:735-7
- Choi, Y.K., Goyal, S.M. & Joo, H.S., (2003). Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs, *The Canadian veterinary journal*, vol:44(9), pp:735-7.
- Choi, Y.K., Ozaki, H., Webby, R.J., Webster, R.G., Peiris, J.S., Poon, L., Butt, C., Leung & Y.H., Guan, Y., (2004a), Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China, *Journal of virological methods*, vol:78(16), pp:8609-14
- Choi, Y.K., Goyal, S.M. & Joo, H.S., (2004b). Evaluation of transmission of swine influenza type A subtype H1N2 virus in seropositive pigs. *American journal of veterinary research*. vol:65. pp:303-306
- Choi, Y.K., Lee, J.H., Erickson, G., Goyal, S.M., Joo, H.S., Webster, R.G. & Webby, R.J., (2004c), H3N2 influenza virus transmission from swine to turkeys, United States, *Emerging infectious diseases*, vol:10(12), pp:2156-60
- Cong, Y.L., Pu, J., Liu, Q.F., Wang, S., Zhang, G.Z., Zhang, X.L., Fan, W.X., Brown, E.G. & Liu, J.H., (2007), Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China, *The Journal of general virology*, 88(Pt 7):2035-41
- De Jong, M.D. & Hien, T.T., (2006), Avian influenza A (H5N1), *Journal of clinical virology*, vol:35, pp:2-13
- Deu, S.B., (2004), *Avances en tecnología porcina*, vol:1, pp:53-61

- European Surveillance Network for Influenza in Pigs (ESNIP1) (2001-2003), disponível em: <http://www.esnip.ugent.be/>
- European Surveillance Network for Influenza in Pigs (ESNIP2) (2006-2008), disponível em: <http://www.esnip.ugent.be/>
- Fleck, R. & Behrens, A., (2002), Evaluation of a maternal antibody decay curve for H1N1 swine influenza virus using the hemagglutination inhibition and the IDEXX ELISA tests, American Association Of Swine Veterinarians, pp:109-110
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (2009), disponível em: <http://www.fao.org/>
- Gibbs, J.S., Malide, D., Hornung, F., Bennick, J.R. & Yewdell, W., (2003), The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipatic hélix that disrupts mitochondrial function, Journal of virology, vol:77, pp:7214-7224
- Gramer, M., (2007), Surveillance for swine influenza virus in the United States, disponível em: www.esnip.ugent.be
- Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Delgado, O., Alvarez-Nistal, D., De La Puente-Redondo, V.A., García-Rioja, F., Martín-Vicente, J. & Rodríguez Ferri, E.F., (2000). Simultaneous serological evidence of Actinobacillus pleuropneumoniae, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs, Research in veterinary science, vol: 68(1), pp:9-13.
- Haiyan, L., Kangzheng, Y., Xiaoguang, X., Huanliang, Y., Yanbing, L., Yunan, Q., Yingzuo, B., Guangzhi, T. & Hualan, C. (2004), Serological and virologic surveillance of swine influenza in China from 2000 to 2003, International Congress Series, Vol: 1263, pp: 754-757
- Halvorson, D.A., Kodihalli, S., Laudert, E., Newman, J.A., Pomery, B.S., Shaw, D. & Sivanandan, V., (1992). Influenza in turkeys in the USA, 1987-1991. Proceedings of Third International Symposium on Avian Influenza, Wisconsin, USA, 27-29 May 1992, pp:33-42
- Hampson, A.W. & Mackenzie, J.S., (2006), The influenza viruses, The Medical journal of Australia, vol:185 (10 Suppl), pp:S39-43.
- Harris, D.L., (2000), Multi-site pig production, Ames, Iowa: Iowa State University Press
- Heinen, P.P., Van Nieuwstadt, A.P., Pol, J.M., de Boer-Luijtz, E.A., van Oirschot, J.T. & Bianchi, A.T. (2000), Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. Viral immunology. Vol: 13, pp :237-47
- Heinen, P.P., Van Nieuwstadt, A.P., Boer-Luijtz, E.A. & Bianchi, A.T., (2001). Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus, Veterinary immunology and immunopathology, vol: 82(1-2), pp:39-56
- Houe, H., Ersbøll, A.K., Toft, N., (2004), Introduction to Veterinary Epidemiology, Denmark, Biofolia
- J, J.S., (1919), A practical method for the field diagnosis of swine disease, American Journal of Veterinary Medicine, vol:14, pp:468

- Jung, K., Song, D.S., Kang, B.K., Oh, J.S. & Park, B.K., (2007), Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea, *Preventive veterinary medicine* vol:79(2-4), pp:294-303
- Karasin, A.I., Schutten, M.M., Cooper, L.A., Smith, C.B., Subbarao, K., Anderson, G.A., Carman, S. & Olsen, C.W., (2000) Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes, *Virus Research*, vol: 68, pp: 71–85.
- Karasin, A.I., West, K., Carman, S. & Olsen, C.W., (2004). Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *Journal of clinical microbiology*, vol:42, pp:4349-4354
- Katz, J.M., Veguilla, V., Belser, J.A., Maines, T.R., Van Hoeven, N., Pappas, C., Hancock, K. & Tumpey, T.M., (2009), The public health impact of avian influenza viruses, *Poultry science*, vol:88(4), pp:872-9.
- Kitikoon, P., Nilubol, D., Erikson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A. & Thacker, E.L., (2006), The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol: 112, PP:117-128.
- Kulken, T., Holmes, E.C., McCauley, J., Rimmelzwaan, G.F., Williams, C.S. & Grenfell, B.T., (2006), Host species barriers to Influenza virus infections, *Science*, vol:312, pp:394-397.
- Lessler, J., Cummings, D.A.T., Fishman, S., Vora, A. & Burke, D.S., (2007), Transmissibility of swine flu at Fort Dix, 1976, *Journal of the Royal Society*, vol: 4(15), pp:755-62
- Lim YK, Takada A, Tanizaki T, Ozaki H, Okazaki K & Kida H. (2001), Mucosal vaccination against influenza: protection of pigs immunized with inactivated virus and ether-split vaccine, *The Japanese journal of veterinary research*, vol:48(4), pp:197-203
- Lipatov, A.S., Kwon, Y.K., Sarmiento, L.V., Lager, K.M., Spackman, E., Suarez, D.L. & Swayne, D.E., (2008), Domestic pigs have low susceptibility to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses, *PLoS pathogens*, vol: 4(7)
- Loeffen, W.L., Kamp, E.M., Stockhofe-Zurwieden, N., van Nieuwstadt, A.P., Bongers, J.H., Hunneman, W.A., Elbers, A.R., Baars, J., Nell, T. & van Zijderveld, F.G., (1999), Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs, *The Veterinary record*, vol: 145(5), pp:123-9
- Loeffen, W. L. A.; Heinen, P. P.; Bianchi, A. T. J.; Hunneman, W. A. & Verheijden, J. H. M. (2003a), Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.92, 23-25.
- Loeffen, W.L., Nodelijk, G., Heinen, P.P., van Leengoed, L.A., Hunneman, W.A. & Verheijden, J.H. (2003b), Estimating the incidence of influenza-virus infections in Dutch weaned piglets using blood samples from a cross-sectional study, *Veterinary microbiology*, vol: 91(4), pp: 295-308
- Loeffen, W., (2008), Population dynamics of swine influenza virus in finishing pigs. Ph.D. Thesis. Utrecht: Universiteit Utrecht

- Loeffen, W.L., Hunneman, W.A., Quak, J., Verheijden, J.H. & Stegeman, J.A., (2009), Population dynamics of swine influenza virus in farrow-to-finish and specialised finishing herds in the Netherlands, *Veterinary microbiology*, Não publicado
- Ma, W., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Brockwell, C.B., Lager, K.M., Janke, B.H., Gauger, P.C., Patnayak, D.P., Webby, R.J. & Richt, J.A., (2007), Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States, *PNAS*, vol: 104 (52), pp: 20949-20954
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B. & de Kruif, A., (2000), Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds, *Veterinary research*, vol: 31(3), pp: 313-27
- Maldonado, J., Van Reeth, K., Riera, P., Sitjà, M., Saubi, N., Espuña, E. & Artigas, C., (2006), Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain, *Veterinary journal*, vol: 172(2), pp:377-81
- Maldonado, J., (2007) Experiencias prácticas sobre el uso y las limitaciones de las analíticas de diagnóstico serológico para la Influenza porcina (IP). Comunicação oral. Laboratorios Hipra S.A., Avedila, Outubro 2007
- Mensik, J. & Valicek, L., (1969), Pathogenesis of experimental influenza in sucking piglets. 2. Persistence of virus in the lungs and in organs outside the respiratory tract, *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, vol: 16, pp: 808-817
- Mensik, J., Pospisil, Z., Franz, J. & Dreslerova, Z., (1971a). Local effect of passively acquired colostral antibody on the development of experimental swine influenza infection in suckling pigs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*., vol:18, pp: 804-818.
- Mensik, J., Valicek, L. & Pospisil, Z., (1971b). Pathogenesis of swine influenza infection produced experimentally in suckling piglets III. Multiplication of virus in the respiratory tract of suckling piglets in the presence of colostrum-derived specific antibody in their blood stream. *Zentralblatt für Veterinärmedizin [B]* vol: 18, pp: 665–678.
- Nakajima, K. (1997), Influenza virus genome structure and encoded proteins, *Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, vol:55(10), pp:2542-6
- Nakamura, R.M., Easterday, B.C., Pawlisch, R. & Walker, G.L., (1972), Swine influenza: epizootiological and serological studies, *Bulletin of the World Health Organization*, vol:47, pp:481-7
- Nakharuthai, C., Boonsoongnarn, A., Poolperm, P., Wajjwalku, W., Urairong, K., Chumsing, W., Lertwicharasarakul, P. & Lekcharoensuk, P., (2008), Occurrence of swine influenza virus infection in swine with porcine respiratory disease complex. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol:39(6), pp:1045-53
- Nardelli, L., Pascucci, S., Gualandi, G.L. & Loda, P., (1978), Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976, *Zentralbl Veterinarmed*, vol:25, pp:853-857
- Office Internacional des Épizooties (2004). OIE Manual of Diagnostic Tests and vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 5th edition, Paris: OIE

- Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C. & Van Reeth, K. (2006). Swine Influenza. In B.E. Straw, J.J. Zimmerman, S. D'Allaire, D.J. Taylor. *Diseases of Swine* (9th ed.). (pp. 469-479). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Organização Mundial da Saúde [OMS] (2009), disponível em <http://www.who.int/en/>
- Peiris, J.S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R.G. & Shortridge, K.F., (2001), Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment?, *Journal of virological methods*, vol:75(20), pp:9679-86
- Reid, A.H., Fanning, T.G., Hultin, J.V. & Taubenberger, J.K., (1999), origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol:96, pp:1651-1656
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. & Kawaoka, Y., (2006) Influenza virus receptors in the human airway, *Nature*, vol: 440, pp :435-436
- Skibbe, D., Zhou, E.M. & Janke, B.H., (2004), Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, vol: 16(1), pp:86-9
- Smith, T.F., Burgert, E.O., Jr, Dowdle, W.R., Noble, G.R., Campbell, R.J. & Van Scoy, R.E., (1976). Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man, *The New England journal of medicine*, vol: 294(13), pp:708-10
- Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P. & Thanawongnuwech, R., (2009), Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial, *Virology journal*, vol: 25;6(1), pp:34
- Sturm-Ramirez, K.M., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrting, K., Rehg, J.E., Poon, L., Guan, Y., Peiris, M. & Webster, R.G., (2004), Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks, *Journal of virology*, vol:78(9), pp:4892-901.
- Suwannakhon, N., Pookorn, S., Sanguansermisri, D., Chamnanpood, C., Chamnanpood, P., Wongvilairat, R., Pongcharoen, S., Niumsup, P.R., Kunthalert, D. & Sanguansermisri, P., (2008), Genetic characterization of nonstructural genes of H5N1 avian influenza viruses isolated in Thailand in 2004-2005, *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, vol:39(5), pp:837-47.
- Tamura, S., Tanimoto, T. & Kurata, T., (2005), Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines, *Japanese journal of infectious diseases*, vol: 58(4), pp:195-207
- Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Janczewski, T.A. & Fanning, T.G., (2001), Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol:356, pp:1829-39
- Thacker, E. & Janke, B., (2008). Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *The Journal of infectious diseases*. Vol:197. pp:19-24

- Van Reeth, K. & Pensaert, M., (1994), Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Veterinary record*, vol: 135, pp: 594-597.
- Van Reeth, K., Nauwynck, H. & Pensaert, M., (1996), Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study, *Veterinary microbiology*, vol:48(3-4), pp: 325-35
- Van Reeth, K., De Clercq, S. & Pensaert, M. (2001). Lack of cross-protection between European H1N1 and H1N2 swine influenza viruses, *International Congress Series*, Vol:1219, pp: 341-345
- Van Reeth, K., Van Gucht, S. & Pensaert, M.. (2002). Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs. *Viral Immunology*. vol:15(4), pp:583-94
- Van Reeth, K., Brown, I., Essen, S. & Pensaert, M., (2004a), Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs, *Virus research*, vol: 103(1-2), pp: 115-24
- Van Reeth, K., Labarque, G. & Pensaert, M., (2004b), Seroprevalence of swine influenza in Europe and interpretation of serologic findings, *International Society for Animal Hygiene*, pp:323-324
- Van Reeth K. (2007). Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary Research*. vol:38(2). pp:243-60
- Webby, R.J. & Webster, R.G., (2001), Emergence of influenza A viruses, *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, vol:356(1416), pp:1817-28
- Wright, P.F., Neumann, G. & Kawaoka, Y. (2007). *Fields Virology* (5thed.), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Yoon, K.J., Janke, B.H., Swalla, R.W. & Erickson, G., (2004), Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, vol:16, pp:197-201

Anexo 1

EPIDEMIOLOGIA DE ENFERMEDADES VÍRICAS PORCINAS

Encuesta núm.

--	--	--

DATOS GENERALES DE LA EXPLOTACIÓN

- Explotación..... Coordenadas Geográficas:.....
- Marca oficial..... • Teléfono del titular:
- Nº trabajadores:..... Con contrato fijo:..... Con contrato temporal (último año):.....
- ¿Pertenece a una integradora? ☐ Si ☐ No
- ¿Qué personas han tenido contacto con los animales en el último mes?
-
- Se permite el consumo de productos de origen porcino dentro de la granja? ☐ si ☐ no
- ¿Tiene alguna otra especie animal en la explotación? ☐ No ☐ Si. Cual?
- ☐ Aves, nº..... ☐ Bovinos, nº..... ☐ Ovinos, nº..... ☐ Perros, nº..... ☐ Gatos, nº..... ☐ Altres.....

CARACTERÍSTICAS DE LA GRANJA

- Clasificación de la explotación:
 - ciclo cerrado ☐ producción de lechones ☐ múltiples fases ☐ (*Especificar tipos*)

- Tipos de manejo:
 - todo dentro todo fuera estricto* : maternidad ☐
 - transición ☐
 - engorde ☐
 - cuarentena ☐
- Censo actual:
 - Nº de reproductoras (*se incluyen primerizas cubiertas*):
 - Nº de verracos:
 - Nº de cerdos en transición:
 - Nº de cerdos de engorde:
- Distancia a la granja más cercana:
- Censo de reproductoras.....
 - Censo de cerdos de engorde.....
- Nº de granjas en 1Km a la redonda:

PRODUCCIÓN

- ¿Cuál es la media de destetados por reproductora/año?.....
- ¿Cuál es el porcentaje habitual de mortalidad en:
Maternidad: Transición:..... Engorde:
- ¿Cuál es el % de reposición?
- ¿Todos los datos están informatizados? ☐ Si ☐ No

INSTALACIONES

	<i>Gestación</i>	<i>Maternidad</i>	<i>Transición</i>	<i>Engorde</i>
Suelo de la nave	Slat/Cemento%/.....% <input type="checkbox"/> Cemento <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál?	Slat/Cemento%/.....% <input type="checkbox"/> Cemento <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál?	Slat/Cemento%/.....% <input type="checkbox"/> Cemento <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál?	Slat/Cemento%/.....% <input type="checkbox"/> Cemento <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál?
Control de ventilación	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual
Sistema de ventilación	<input type="checkbox"/> Forzada <input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Mixta	<input type="checkbox"/> Forzada <input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Mixta	<input type="checkbox"/> Forzada <input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Mixta	<input type="checkbox"/> Forzada <input type="checkbox"/> Natural <input type="checkbox"/> Mixta
Control de calefacción	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual	<input type="checkbox"/> Sin control <input type="checkbox"/> Automático <input type="checkbox"/> Manual
Sistema de calefacción	<input type="checkbox"/> Radiador <input type="checkbox"/> Placa <input type="checkbox"/> Otros.....	<input type="checkbox"/> Radiador <input type="checkbox"/> Placa <input type="checkbox"/> Otros.....	<input type="checkbox"/> Radiador <input type="checkbox"/> Placa <input type="checkbox"/> Otros.....	<input type="checkbox"/> Radiador <input type="checkbox"/> Placa <input type="checkbox"/> Otros.....
Disponen de patio	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No

	<i>Transición</i>	<i>Engorde</i>
Particiones entre corrales	<input type="checkbox"/> Continua <input type="checkbox"/> Discontinua <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál?	<input type="checkbox"/> Continua <input type="checkbox"/> Discontinua <input type="checkbox"/> Otros, ¿Cuál?
Tipo de bebedero	<input type="checkbox"/> Xumete <input type="checkbox"/> Cazoleta <input type="checkbox"/> Otro, ¿Cuál?.....	<input type="checkbox"/> Xumete <input type="checkbox"/> Cazoleta <input type="checkbox"/> Otro, ¿Cuál?.....
Bebedero dentro del comedero	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
El pienso se dispensa de forma:	<input type="checkbox"/> Automática <input type="checkbox"/> Manual, ¿Cómo?.....	<input type="checkbox"/> Automática <input type="checkbox"/> Manual, ¿Cómo?.....
Material del bebedero	<input type="checkbox"/> Metálico <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Hormigón	<input type="checkbox"/> Metálico <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Hormigón

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Entrada de animales:

- N° de muelles de carga y descarga en la granja.....
- Distancia del muelle de carga y descarga a la nave más próxima:m
- Cada cuánto se producen las entrada de reposición: cada semanas

Reposición

- • Origen de las primerizas:
 - ☐ Propio
 - ☐ Externo ¿Cuántos?.....
 - ☐ ¿Se realiza cuarentena? ☐ Si ☐ No ¿Existe sala específica de cuarentena? ☐ Si ☐ No
 - Distancia de cuarentenas a los edificios principales:
 - Tiempo de cuarentena:

- Rutina de higiene y desinfección

Se limpian las salas de:

- maternidad ☐
- transición ☐
- engorde ☐
- cuarentena ☐

Se desinfectan las salas de:

- maternidad ☐
- transición ☐
- engorde ☐
- cuarentena ☐

- ¿Qué sistema utiliza para limpiar?
 - ☐ Agua a presión caliente
 - ☐ Agua a presión fría
 - ☐ Raspado
 - ☐ Otras (especificar).....
- ¿Qué tipo de desinfectante ha empleado (puede indicar el nombre comercial)?
.....

- Drenaje de purines

- Fosa de purines: ☐ Fosa única ☐ Fosas múltiples
- ¿El drenaje de purines es a cielo abierto? ☐ Si ☐ No

- Control de plagas

- ¿Presencia de malla para evitar la entrada de aves? ☐ Sí ☐ No
- ¿Las puertas de las naves están siempre cerradas? ☐ Sí ☐ No
- ¿Realizan plan de desratización? ☐ No
☐ Si ¿Quién lo realiza? ☐ Propietario
☐ Empresa comercial
- Realizan plan de desinsectación: ☐ No
☐ Si ¿Quién lo realiza? ☐ Propietario
☐ Empresa comercial

Cloración de las aguas

- ¿Procedencia del agua de bebida? ☐ Pozo propio
☐ Pueblo
☐ Otros:.....
- ¿Hace cloración de las aguas?
 - ☐ No
 - ☐ Si. ¿Qué sistema utiliza? ☐ Automático
☐ Manual
- ¿Cada cuánto lo realiza?
- ¿Cada cuánto verifica la potabilidad del agua?
- ¿Como hace la verificación?

PROYECTO CONSOLIDER

ESTADO SANITARIO

	Seropositivo	Seronegativo
Aujeszky	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PRRS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros:		

Programa de vacunación de reproductoras: indicar el momento de la vacunación

PRRS	<input type="checkbox"/>
E.coli	<input type="checkbox"/>
Clostridium	<input type="checkbox"/>
Otros:		

Programa de vacunación de lechones y cerdos de engorde: indicar el momento de la vacunación

PRRS	<input type="checkbox"/>
Mycoplasma	<input type="checkbox"/>
Otros	<input type="checkbox"/>

✓ Programa de vacunación para Influenza:

☐ No

¿Se ha vacunado en algún periodo anterior? ☐ No ☐ Si

☐ Si (indicar momento de vacunación)

Maternidad

Lechones y engorde.....

• ¿Han padecido algún problema entérico en el último año?

☐ No

☐ Si ¿A qué edad?.....

• ¿Se realizó algún tipo de diagnóstico? ☐ Clínico ☐ Necropsia ☐ Laboratorial

• ¿Cuál fue el diagnóstico?.....

• ¿Qué tratamiento se empleó para controlarlo?.....

• ¿Cuál fue la vía de aplicación? ☐ Pienso ☐ Agua ☐ Inyectable

• ¿Han padecido algún problema respiratorio en el último año? (sobre todo si pudo estar relacionado con influenza).

☐ No

☐ Si ¿A qué edad?.....

• ¿Se realizó algún tipo de diagnóstico? ☐ Clínico ☐ Necropsia ☐ Laboratorial

• ¿Cuál fue el diagnóstico?.....

• ¿Qué tratamiento se empleó para controlarlo?.....

• ¿Cuál fue la vía de aplicación? ☐ Pienso ☐ Agua ☐ Inyectable

• Presencia de enfermería. ☐ No ☐ Engorde ☐ Transición

• Localización de la enfermería: ☐ Dentro de las naves ☐ Fuera de las naves

OPINIÓN DEL GRANJERO

• Cite las 5 medidas de bioseguridad más importantes para la prevención de entrada de enfermedades

• Cite las 5 medidas de bioseguridad que considere más importantes ante la declaración de un brote de una enfermedad altamente contagiosa:

• En una escala del 0 (no lo cumplo nada) al 10 (lo cumplo totalmente), cuál es su cumplimiento de la medidas de bioseguridad: 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10